



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**TRANSPORTNÍ VLASTNOSTI HYDROGELOVÝCH
SYSTÉMŮ NA BÁZI HYALURONANU**

TRANSPORT PROPERTIES OF HYALURONAN-BASED HYDROGEL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martina Káčeríková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1199/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Martina Káčeríková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi hyaluronanu

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou hydrogelů a transportních procesů.
2. Prozkoumat možnosti studia transportu v hydrogelech.
3. Navrhnout a provést transportní experimenty v hydrogelech na bázi hyaluronanu.
4. Zhodnocení výsledků a závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martina Káčeríková
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá preštudovaním transportných vlastností hydrogélů pripravovaných interakciou hyaluronanu s tenzidom karbetopendeciniumbromidu (Septonex). Na preskúmanie schopnosti absorbovania či uvoňovania látky bola použitá nílka červená, ako sonda na sledovanie tohto javu. Všetky hydrogély boli pripravované tzv. „mokrou“ cestou, kde sa pripravili zásobné roztoky hyaluronanu a tenzidu. Nílka červená bola vždy pripravená v roztoku tenzidu, kedy sa po zmiešaní s hyaluronanom vytvorili zafarbené gély. Metódou spektrofotometrie boli následne zmerané absorbancie pôvodných ale aj zamenených supernatantov v sadách gélov po 24, 72 a 168 hodinách.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of transport properties of hydrogels, that were prepared by interaction of hyaluronan with karbethopendecinium bromide (Septonex), as a surfactant. Nile red is a fluorescent probe to determine the ability of the system to absorb or to release the substance. All the hydrogels were prepared by the „wet“ way, where the solutions of hyaluronan and surfactant were prepared first. Nile red was prepared in the solution of tenzide, which after the mixing with hyaluronan produced colorful gels. By the spectrophotometric measurement, the absorbance of supernatants were observed. The absorbance was measured in original but also in changed supernatats after 24, 72 and 168 hours.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

hyaluronan, Septonex, nílka červená, difúzia, transportné vlastnosti, uvoľňovanie, spektrofotometria

KEYWORDS

hyaluronan, Septonex, nile red, diffusion, transport properties, releasing, spectrophotometr

KÁČERÍKOVÁ, M. *Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi hyaluronanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 60 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne ocitovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovannje:

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať mojej vedúcej bakalárskej práce prof. Ing. Martine Klučákovvej Ph.D., za odborné vedenie, ústretovosť a cenný čas, ktorý mi venovala. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. et Ing. Sabíne Jarábkovej za čas, ktorý mi venovala pri meraniach a za pomoc a rady pri spracovávaní tejto práce. Takisto by som sa poďakovala Ing. Tomášovi Velcerovi za ochotu a pomoc počas meraní a diskutovaní výsledkov. Špeciálne poďakovanie patrí mojej rodine a priateľom, ktorí ma podporovali po celú dobu štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
	2.1 Polyelektrolyty	8
	2.2 Hyaluronan	8
	2.2.1 História	8
	2.2.2 Štruktúra	8
	2.2.3 Funkcie	10
	2.2.4 Výskyt, vlastnosti a využitie	10
	2.2.5 Príprava a výroba	11
	2.3 Tenzidy	11
	2.3.1 Klasifikácia	12
	2.3.2 Micely	12
	2.4 Gély	14
	2.4.1 Delenie a vznik gélov	14
	2.4.2 Vlastnosti a využitie gélov	16
	2.5 Hydrogély	17
	2.5.1 Príprava a využitie hydrogélů	17
	2.6 Difúzia a I. Fickov zákon	17
	2.6.1 II. Fickov zákon	18
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	20
	3.1 Hyaluronan v cieľenej distribúcii	20
	3.2 Interakcie hyaluronan-tenzid	21
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
	4.1 Materiály	22
	4.2 Použité programy a prístroje	22
	4.3 Príprava zásobných roztokov a vzoriek hydrogélů	22
	4.3.1 Príprava zásobného roztoku NaCl	22
	4.3.2 Príprava zásobného roztoku hyaluronanu	22
	4.3.3 Príprava zásobného roztoku tenzidu	22
	4.3.4 Príprava kalibračných roztokov nílskej červene	23
	4.3.5 Príprava hydrogélů	23
	4.4 Metódy merania a experimentov	25
	4.4.1 Uvoľňovanie sondy z gélov H1, H2, H4 a H5	25
	4.4.2 Uvoľňovanie sondy z plošného zdroja	26

5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	28
	5.1 HMW Hyaluronan s 200 mM Septonexom	28
	5.1.1 H1 s pôvodným supernatantom	29
	5.1.2 H1 s vymeneným supernatantom za NaCl	31
	5.1.3 H1 s vymeneným supernatantom za Septonex	33
	5.2 HMW Hyaluronan so 100 mM Septonexom	35
	5.2.1 H2 s pôvodným supernatantom	36
	5.2.2 H2 s vymeneným supernatantom za NaCl	38
	5.2.3 H2 s vymeneným supernatantom za Septonex	39
	5.3 LMW Hyaluronan s 200 mM Septonexom.....	41
	5.3.1 H4 s pôvodným supernatantom	43
	5.3.2 H4 s vymeneným supernatantom za NaCl	45
	5.3.3 H4 s vymeneným supernatantom za Septonex	47
	5.4 LMW Hyaluronan so 100 mM Septonexom.....	48
	5.4.1 H5 s pôvodným supernatantom	49
	5.4.2 H5 s vymeneným supernatantom za NaCl	51
	5.4.3 H5 s vymeneným supernatantom za Septonex	52
6	ZÁVER	55
7	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	56
8	ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV.....	60
	8.1 Zoznam skratiek.....	60
	8.2 Zoznam symbolov.....	60

1 ÚVOD

Hydrogély sú definované ako koloidné disperzie s trojrozmernou polymérnou sieťou. Vznikajú interakciou polymérnych reťazcov a vody za účasti sieťovacích činidiel ako sú micely. Hyaluronan je telu vlastná látka, a teda je ako biopolymér často využívaný práve pri výrobe hydrogélů. Svojimi jedinečnými vlastnosťami sa uplatňuje v rôznych odvetviach medicíny, kozmetiky či farmácie. Aplikuje sa pri výrobe kontaktných šošoviek, pri zákrokoch v estetickej medicíne, ako prísada v rôznych krémoch v starostlivosti o pleť či v potravinárskom priemysle. Svoje uplatnenie však našiel hlavne tkanivovom inžinierstve pri hojení rán a v cielenej distribúcii liečiv. Je to preto, lebo tieto systémy dokážu uzavrieť veľké množstvo nepolárnych látok, liečiv do nosičov, a tak ich dopraviť na postihnuté miesto. Nemodifikovaný hyaluronan ale svojou štruktúrou nie je schopný nepolárne látky viazať, a preto sa najprv musí spomenutými interakciami upraviť tak, aby sa vytvoril fázovo separovaný hydrogél. Skvelou vlastnosťou je aj fakt, že tieto nosiče predlžujú pôsobenie účinku liečiva a tým pádom je znížená aj účinná koncentrácia látky v tele. K týmto účelom je však potrebné poznať a porozumieť charakteru fyzikálno-chemických vlastností hydrogélů. Takisto je potrebné poznať aj model transportu, ktorý by popisoval uvoľňovanie látok z týchto systémů.

Cieľom tejto práce bolo preskúmať transportné vlastnosti hydrogélů na báze hyaluronanu. Ako transportná látka bolo použité farbivo nílka červeň, ktorá bola použitá ako sonda, pri ktorej absorpčnom maxime bola zmeraná absorbanca supernatantů v pripravených géloch. V jednotlivých sadách gélov boli supernatanty vymenené za fyziologický roztok 0,15 M NaCl a tenzidu Septonexu, kde sa skúmal vplyv prítomnosti difúzie týchto látok v určitých časových intervaloch.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty sa radia medzi polyméry, ktoré vznikajú v dôsledku prítomnosti postranných skupín v molekule schopných elektrolytickej disociácie. Môžeme o nich hovoriť ako o roztokoch vysokomolekulárnych látok, ktoré vznikajú disociáciou v polárnych rozpúšťadlách. V roztoku teda vznikajú ióny a podľa povahy prítomných skupín schopných disociácie sú polyelektrolyty rozdeľované na polyelektrolyty obsahujúce skupiny kyslé (-COOH), zásadité (-NH₂) a amfotérne polyelektrolyty, ktoré vo svojich postranných reťazcoch obsahujú jednak skupiny zásadité, tak skupiny kyslé. Pokiaľ bude disociovať polyelektrolyt s bázičnou skupinou, jeho výsledný náboj bude kladný, a naopak, výsledný náboj polyelektrolytu s kyslou skupinou bude záporný. Pri amfotérnych polyelektrolytoch bude náboj závislý na pH prostredia. Disociáciou vznikne makroión, ktorý sa skladá z veľkého počtu elementárnych nábojov a ekvivalentného počtu malých iónov s opačným nábojom nazývaných protiióny. Povaha makroiónu závisí na ionizovateľných skupinách, potom rozoznávame medzi makrokatiónom alebo makroaniónom. Celkové chovanie polyelektrolytov závisí na koncentrácii, hustote náboja na reťazci, na kvalite rozpúšťadla, či na prítomnosti iných, napríklad nízkomolekulárnych látok. Z biologického hľadiska sú veľmi významné hlavne amfotérne polyelektrolyty, ktorých zástupcovia sú napríklad proteíny či nukleové kyseliny [1, 2, 3, 4].

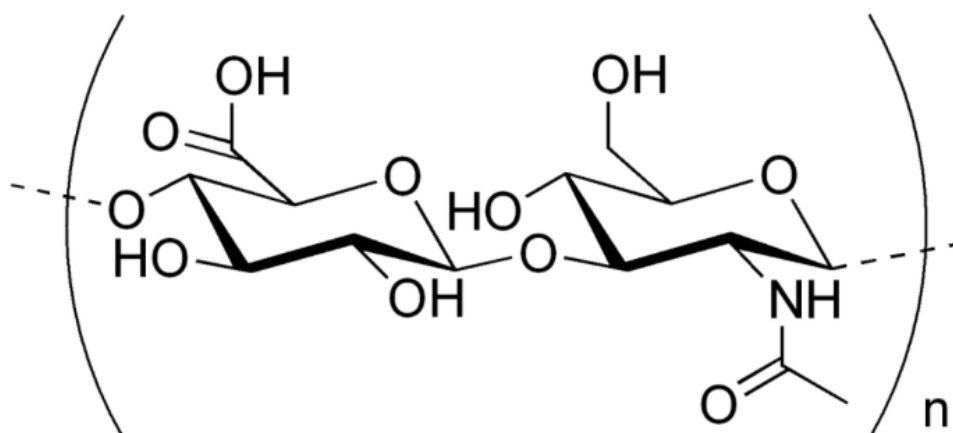
2.2 Hyaluronan

2.2.1 História

V roku 1934 John Palmer a Karl Meyer popísali doposiaľ neobyčajnú štruktúru polysacharidu s veľmi vysokou molekulovou hmotnosťou, vyizolovanú zo sklovca hovädzieho dobytku. Keďže boli prví, ktorí sa o tom dovtedy zmienili, nazvali túto novú hmotu ako hyaluronová kyselina. V čase objavu kyseliny hyalurónovej, boli polysacharidy, ktoré predstavujú jednu z hlavných zložiek organického materiálu, veľmi dobre známe. Vtedy nazývané mukopolysacharidy, dnes známe ako glykozaminoglykány, boli v tej dobe už objavené. Hyaluronová kyselina do tejto skupiny patrí tiež, avšak neobsahuje sulfoestery. Mukopolysacharidy boli izolované z hlienu, vďaka ktorému majú veľmi dobré viskózne vlastnosti. Tieto vlastnosti súvisia so schopnosťou glykozaminoglykánov viazať značné množstvo vody [5, 6].

2.2.2 Štruktúra

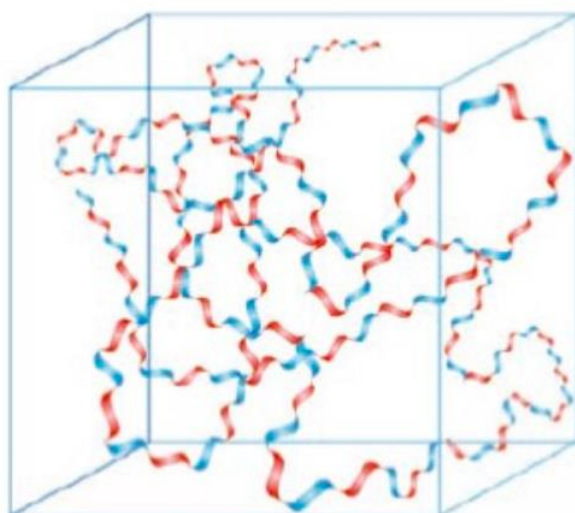
Kyselina hyalurónová, ako zložka extracelulárneho matrix, je vysokomolekulárny glykozaminoglykán zložený z opakujúcich sa disacharidových jednotiek N-acetyl-D-glukozamínu a D-glukurónovej kyseliny. Sú spojené striedajúcimi sa β -1,4 a β -1,3 glykozidickými väzbami. Celá štruktúra je energeticky veľmi stabilná. V molekule kyseliny hyalurónovej môže byť viac ako 10 000 opakujúcich sa disacharidových jednotiek a všetky glukurónové jednotky nesú v disociovanom stave za fyziologických podmienok záporný náboj. Tento záporný náboj sa kompenzuje kationmi, najmä Na⁺ a K⁺. Keď sa kyselina hyalurónová nachádza vo forme sodnej, či inej soli, nazýva sa hyaluronan [6].



Obr. 1: Štruktúra kyseliny hyalurónovej [7]

Vo fyziologickom roztoku je kostra hyaluronanu spevnená kombináciou chemickej štruktúry disacharidu, vnútorných vodíkových väzieb a interakciami s rozpúšťadlom. Axiálne vodíkové atómy vytvárajú nepolárnu časť, zatiaľ čo ekvatoriálne bočné reťazce tvoria viac polárnu, hydrofilnú časť, čím sa modeluje štruktúra stočenej stuhý nazývaná ako tzv. „random coil“, zobrazená na obr 2. Molekula hyaluronanu je teda amfifílnou molekulou preto, lebo obsahuje hydrofilnú ale aj hydrofóbnu časť [6, 8].

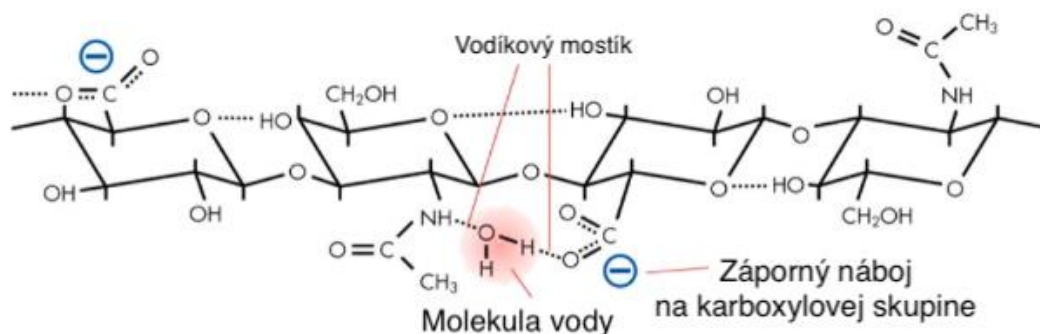
Reťazce hyaluronanu sa často krát líšia svojou dĺžkou. V dôsledku toho majú rozličnú aj molekulovú hmotnosť, na základe čoho rozlišujeme medzi nízkomolekulárnym a vysokomolekulárnym hyaluronanom. Ako bolo uvedené už v predošlom odstavci, v jednej molekule sa môže nachádzať až 10 000 disacharidových podjednotiek a celková molekulová hmotnosť sa môže vyšplhať až na 4 MDa, Da je atómová hmotnostná jednotka. 1 Da je $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg. Priemerná dĺžka disacharidovej podjednotky je menej než 1 nm, avšak molekula hyaluronanu obsahujúca 10 000 opakujúcich sa podjednotiek môže dosiahnuť až 10 μ m. Touto veľkosťou sa dá prirovnať k priemeru ľudského erytrocytu [8].



Obr. 2: Model hyaluronanu vo fyziologickom roztoku [9]

2.2.3 Funkcie

Hydrofilná časť molekuly hyaluronanu zohráva hlavnú rolu vo viazaní sa na vodu oveľa viac než ostatné biopolyméry. Je to vďaka veľkému množstvu -OH skupín nachádzajúcich sa v jeho štruktúre. Vo vodnom roztoku sa tvorí vodíkový mostík medzi aminoskupinami a karboxylovými skupinami a molekulou vody. Tento mostík má dôležitú úlohu v stabilizovaní štruktúry hyaluronanu [10].



Obr. 3: Hyaluronan vo vodnom roztoku tvoriaci vodíkové mostíky [11]

Vďaka dobrým fyzikálnym a biochemickým vlastnostiam má hyaluronan významnú rolu vo fyziologických procesoch. Chráni a zvlhčuje jemné tkanivá čo je dôsledkom jeho viskoelastických vlastností. Napomáha v procesoch bunkovej diferenciácie či proliferácie, v tkanivách zas udržiava vysoké množstvo vody. V bunke transportuje živiny a reguluje distribúciu proteínov [10].

2.2.4 Výskyt, vlastnosti a využitie

Zásluhou dobrých, viskózných, elastických a hygroskopických vlastností hyaluronan nachádza široké uplatnenie v biomedicínskych, biochemických či bioorganických aplikáciach. Medzi jeho hlavné výhody patrí biodegradabilita a biokompatibilita. Je prirodzene nachádzajúci sa v prírode, v jemných tkanivách stavovcov, v kĺboch, ako komponent synoviálnej tekutiny, v očných sklovcoch či v pupočnej šnúre. Všetky stavovce majú hyaluronan obsiahnutý ako hlavnú zložku extracelulárnej matrix. Najväčší podiel hyaluronanu prináleží pokožke a je obsiahnutý ako v dermis, tak i v epidermis. Tým, že hyaluronan dokáže viazať veľké množstvo vody, zabezpečuje stálu hydratáciu pokožky, uplatňuje sa v hojení rán, má antizápalové a dezinfekčné účinky. Podporuje epiteliálnu regeneráciu, zásluhou čoho sa na pokožke predchádza v tvorbe zrástov a jaziev, zmierňuje svrbenie či opuch. Vďaka tomuto zisteniu našiel svoje uplatnenie aj v kozmetike, kde sa hyaluronan využíva ako prísada v rôznych krémoch a v starostlivosti o pokožku. Svoje využitie našiel aj v estetickej medicíne, a keďže sa nachádza aj v očnom sklovci, uplatňuje sa pri operáciách šedého zákalu. S rozvojom nanotechnológií sa dostalo veľkej pozornosti práve hyaluronanu ako nosiču liečiv, ktorý cielene distribuuje liečivá do orgánov, tkanív či buniek [12, 13, 14].

Pri cielenej distribúcii liečiv ide o dej, kedy je liečivo (aktívna látka) zabudované dovnútra nosiča a je dopravené až do postihnutej oblasti. V ideálnom prípade so zdravým tkanivom neinteraguje. Ide teda o EPR efekt (z angl. *Enhanced Permeability and Retention*), čiže o zvýšenú priepustnosť a zádrž, pretože veľké molekuly sa do nádorových tkanív dostávajú ľahšie, a potom sa tam hromadia (aj o rád od okolného tkaniva). Uvoľnenie liečiva z nosiča je ovplyvňované viacerými faktormi, napríklad ultrazvukom, zmenou pH, zmenou teploty

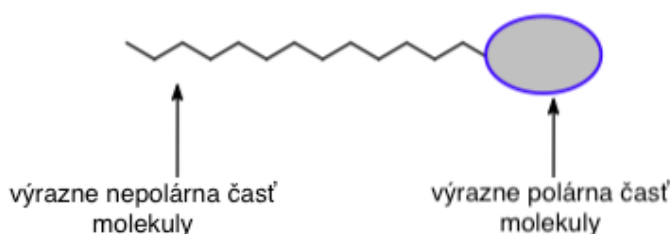
či elektromagnetickým poľom. Pre cieleňú distribúciu liečiv sa využívajú interakcie s karboxylovými alebo hydroxylovými skupinami na reťazci hyaluronanu. Ďalší spôsob je zabudovávanie liečiv do micel, pretože micely sú z biokompatibilných a biodegradovateľných polymérov [15, 16, 17].

2.2.5 Príprava a výroba

Hyaluronan možno extrahovať z tkanív stavovcov alebo z baktérií, ktoré vytvárajú ochrannú kapsulu z polysacharidov, pomocou mikrobiálnej fermentácie. Obe metódy, extrakcia a fermentácia, produkujú vysokomolekulárny hyaluronan, využívaný hlavne v biomedicínskych a kozmetických aplikáciách. Pre proces získavania hyaluronanu pomocou extrakcie, boli využívané hrebienky sliepok a kohútov. Zahŕňa na seba naväzujúce fázy ako homogenizácia tkanív, následná extrakcia, purifikácia a finálna preparácia HA produktu. Konečný produkt môže byť vo forme granúl, prášku alebo roztoku. Posledné dve dekády 20. storočia v produkcii hyaluronanu bakteriálnou fermentáciou viedli k vývinu veľmi rozvinutých a prepacovaných technológií. K výrobe hyaluronanu sa používajú gram-pozitívne baktérie, a ako už bolo spomenuté, syntetizujú polysacharidy z kapsúl, ktoré tvoria. Keďže je väčšina takýchto mikroorganizmov pre ľudí patogénna, sú na ne kladené vysoké požiadavky. Nemali by vykazovať patogénnu a hemolytickú aktivitu, mali by byť schopné syntetizovať vysokomolekulárny hyaluronan v krátkom čase, tak isto by mali byť pri skladovaní stabilné a mali by využívať substrát najviac ako je možné. Moderné metódy využívajú baktérie z rodu *Streptococcus*, ktorých gén je pozmenený pomocou klonovania hyaluronidázového génu. Týmto sa patogénna forma transformuje na nepatogénnu baktériu. Celkový proces bakteriálnej fermentácie pozostáva z kultivácie vo vhodných podmienkach a akumulácii budúceho produktu v živnom médiu. Konečný proces úpravy produktu pozostáva z odstránenia mikroorganizmov a nízkomolekulárnych substancií pomocou ultrafiltrácie alebo precipitácie. Purifikáciou dostávame produkt vo forme prášku alebo 1 % roztoku [5, 18].

2.3 Tenzidy

Organickú látku, ktorá je schopná sa hromadiť už pri nízkych koncentráciách na fázovom rozhraní a tým znižovať medzifázovú energiu sústavy, nazývame tenzid. Často sú nazývané aj ako povrchovo aktívne látky. Je pre ne typická ich polárne-nepolárna molekulová stavba, inak nazývaná aj amfipatická, čo znamená, že obsahuje hydrofóbnu nepolárnu časť a výrazne polárnu, hydrofilnú časť. Nepolárne časti molekuly sa na fázovom rozhraní orientujú do nepolárnej fázy, zatiaľ čo polárna časť smeruje do polárnej fázy [19].



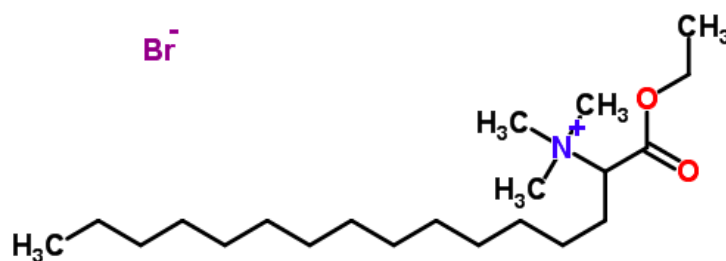
Obr. 4: Stavba tenzidu [16]

2.3.1 Klasifikácia

Podľa schopnosti disociovať vo vodnom roztoku môžeme povrchovo aktívne látky rozdeliť na iónogénne (aniónové, kationové, amfoterné) a neiónogénne. Kationové povrchovo aktívne látky tvoria pri disociácii povrchovo aktívne kationy. Medzi kationaktívne tenszidy sú zahrnuté predovšetkým kvartérne amóniové soli – invertné mydlá. Majú avivážny a mikrobicídny účinok, ktorý sa využíva pri úprave syntetických textílií po vypraní. Aniónaktívne tenszidy sú najpočetnejšou skupinou tenszidov. Ich najznámejšími predstaviteľmi sú alkalické soli vyšších mastných kyselín – prirodzené mydlá. Amfoterné tenszidy vo svojej polárnej časti molekuly obsahujú záporný aj kladný náboj. Patria sem napríklad fosfatidylcholín, fosfatidylserín či sfingomyelín, ako predstavitelia prírodných látok. Zo syntetických tenszidov sú tu zahrnuté deriváty betaínu. Neiónogénne tenszidy nie sú schopné elektrolytickej disociácie, neobsahujú teda náboj a obvykle sa skladajú z dlhého uhl'ovodíkového reťazca. Radia sa sem estery alebo étery polyetylénglykolu, monoacylglyceroly alebo saponíny, čo sú prirodzené látky obsiahnuté v rastlinách [1, 2, 21].

2.3.1.1 Septonex

Septonex alebo karbethopendeciniumbromid je zástupcom kationaktívnych tenszidov, to znamená, že vo vodnom roztoku nesie kladný náboj. Jedná sa o zlúčeninu tvorenú kvartérnou amóniovou soľou, ktorá tvorí hydrofilnú hlavu, brómovým protiiónom a dlhším uhlíkatým reťazcom, ktorý tvorí hydrofóbnu časť tenszidu. Jedná sa o biely prášok, veľmi dobre rozpustný vo vode, ale aj v organických rozpúšťadlách. Jeho vodný roztok má tendenciu silno peniť, avšak intenzita penenia závisí od samotnej koncentrácie Septonexu v roztoku. Je známy svojimi antiseptickými a dezinfekčnými účinkami a býva obsiahnutý v mnohých farmaceutických výrobkoch ako sú napríklad očné kvapky na liečbu zápalov oka či zásypy na dezinfekciu poranení a rán [22].

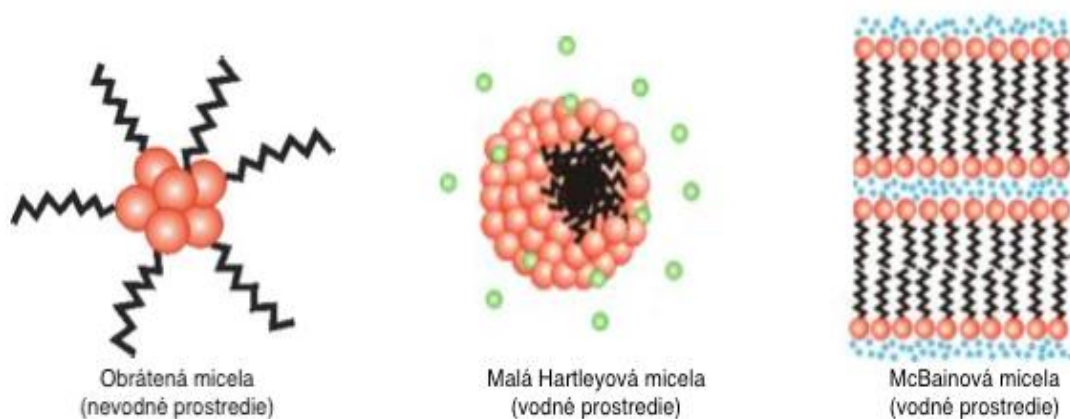


Obr. 1: Štruktúrny vzorec Septonexu [23]

2.3.2 Micely

Rozpustením malého množstva tenszidu vo vodnom roztoku nastane adsorpcia jeho molekúl na fázovom rozhraní – povrchu kvapaliny, kedy sa vytvára tzv. monomolekulárna vrstva. Pri vyšších koncentráciách tenszidu dochádza na fázovom rozhraní k nasýteniu (povrch kvapaliny je úplne saturovaný molekulami tenszidu a zvyšuje sa koncentrácia voľných molekúl tenszidu vo vnútri fázy). Po prekročení tzv. kritickej micelárnej koncentrácie dochádza k asociácii molekúl rozpúšťanej látky do väčších celkov – micel. Aby dochádzalo k tejto asociácii, musia mať tenszidy dostatočne dlhý uhl'ovodíkový reťazec. Ďalšie faktory

ovplyvňujúce CMC sú napríklad teplota či tlak, povaha hydrofilnej skupiny alebo prítomnosť ďalších látok v roztoku. Jadro micely vo vodnom prostredí je tvorené uhl'ovodíkovými reťazcami, a na vonkajšom povrchu micely sú situované hydrofilné skupiny. Tým je zaručený minimálny styk hydrofóbnej časti molekuly s vodou. Micely sa dokážu vytvoriť aj v nevodnom prostredí. Ich jadro je vytvorené polárnymi skupinami, zatiaľ čo uhl'ovodíkové reťazce smerujú do nepolárneho prostredia. Takýmto micelám hovoríme reverzné micely. Veľkosť či tvar micel je závislá na rade faktorov, ako sú napríklad teplota, koncentrácia či charakter medzimolekulárnych síl. V zriedených roztokoch bolo pomocou metód rozptylu svetla dokázané, že vznikajú malé, tzv. Hartleyové micely. Majú tvar guľovitého agregátu. Ich uhl'ovodíkové reťazce sú navzájom poprepletané, a tak vytvárajú jadro micely. Naopak ich polárne skupiny smerujú von, do polárnej fázy. So zvyšujúcou sa koncentráciou nastáva zmena v rozmere aj symetrii micel a uhl'ovodíkové reťazce majú tendenciu orientovať sa navzájom rovnobežne. Postupne sa micely pretvárajú na valcovité útvary a pri ešte vyššej koncentrácii vznikajú laminárne, tzv. McBainové micely, ktoré sú vytvorené z dvoch vrstiev povrchovo aktívnych látok. Svojimi uhl'ovodíkovými reťazcami sú obrátené k sebe a iónogénne skupiny smerujú von. [1, 2, 21, 24].

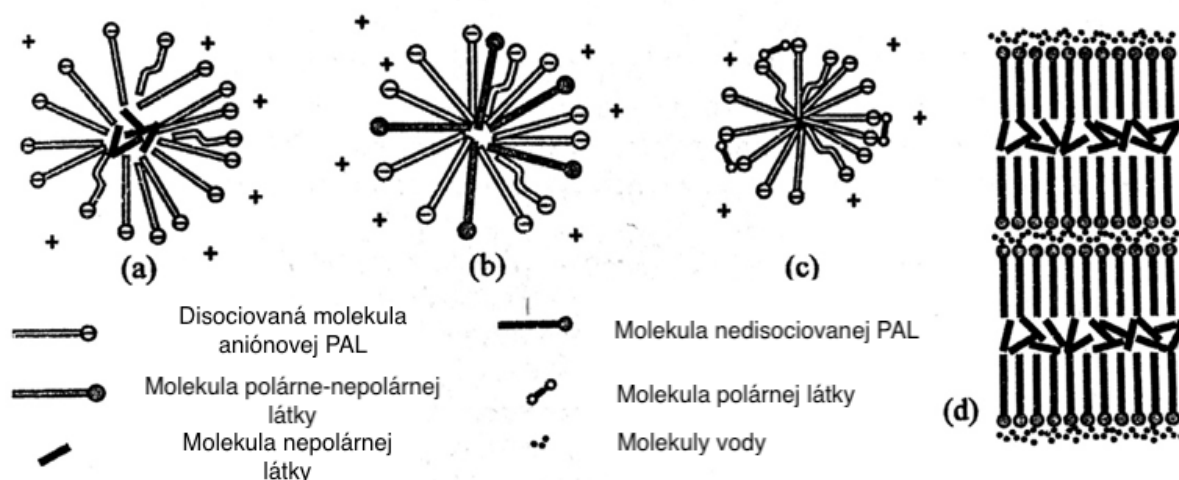


Obr. 2: Tvary micel vo vodnom a nevodnom prostredí [24]

2.3.2.1 Solubilizácia

Solubilizácia je významnou vlastnosťou micelárnych koloidov, ktorá ovplyvňuje stavbu micel. Je to schopnosť rozpúšťať látky, ktoré nie sú v čistom disperznom prostredí rozpustné. To znamená, že sú niektoré amfipatické či hydrofóbne látky lepšie rozpustné v roztoku mydla ako vo vode. Mechanizmus solubilizácie môže byť rôzny. Pri polárnych organických látkach rozpúšťanie funguje tak, že sa ich uhl'ovodíkové reťazce nasmerujú dovnútra micely a polárne skupiny do vodnej fázy. Polárne látky, ktoré majú kratší reťazec sú adsorbované na povrchu micely alebo sú v tesnej blízkosti jej povrchu. Nepolárne látky sa naopak rozpúšťajú v jadre micely. Laminárne micely rozmiestňujú organické látky medzi uhl'ovodíkovými koncami molekúl, a tým sa od seba molekulové reťazce oddávajú. Rast hmotnosti povrchovo aktívnej látky je spôsobený jednak zabudovaním solubilizátu do micely, ale aj zväčšením objemu hydrofóbneho jadra čo vedie k nárastu v počte molekúl povrchovo aktívnych látok, ktoré tvoria micelu. Z praktického hľadiska má solubilizácia veľký význam. Využité nachádza pri detergentii, teda praní znečistených povrchov. V tomto procese sa zo zriedeného vodného

roztoku povrchovo aktívnej látky najprv adsorbujú na povrch vlákna, olejovité vrstvy či ďalšie nečistoty, ktoré priliehajú k povrchu pevnej látky. Tie sa potom postupne zbaľujú a uvoľňujú. Po prechode do roztoku pomocou micel dochádza k solubilizácii, následne potom solubilizovaná nečistota nadobúda hydrofílny charakter, ktorý nečistote ďalej nedovoľuje pripútať sa naspäť k čistému povrchu. Solubilizácia nachádza uplatnenie aj pri emulznej polymerácii nenasýtených uhlíkov pri syntéze latexov. Ďalej sa solubilizácia uplatňuje v kozmetickom či farmaceutickom priemysle, pri výrobe herbicídov, insekticídov alebo fungicídov. V potravinárskom priemysle sa uplatňuje proces obrátenej solubilizácie. Tá nastáva vtedy, keď máme systém s nepolárnym prostredím, kde vznikajú hydrofílné jadrá micel a hydrofóbny povrch [1, 2, 21].



Obr. 3: Rôzne mechanizmy solubilizácie (a) začlenenie do jadra, (b) začlenenie medzi jednotlivé tenzidy, (c) solubilizácia na povrch, (d) začlenenie medzi uhlíkové konce molekúl v laminárnych micelách [21]

2.4 Gély

Gély môžeme charakterizovať ako koloidné disperzie tuhých látok v kvapalinách. Roztoky makromolekúl alebo lyofóbne soly majú spoločnú schopnosť, a to vytvárať gély, respektíve gélovať. Zo štruktúrneho hľadiska ich je možno definovať ako systémy, ktoré sú tvorené trojrozmernou sieťou. Táto trojrozmerná sieť vytvára súvislú štruktúru, ktorá prestupuje celým disperzným prostredím. Sieť môže vzniknúť z lineárneho polyméru či jeho roztoku, pokiaľ sa medzi makromolekulami vytvorí dostatočný počet spojov. Spoje, inak nazývané aj uzly siete, môžu vzniknúť chemickou reakciou. Vtedy hovoríme o kovalentne sieťovaných géloch. Pokiaľ gél vznikne interakciou medzimolekulárných fyzikálnych síl, takýto gélom hovoríme, že sú fyzikálne sieťované gély [1].

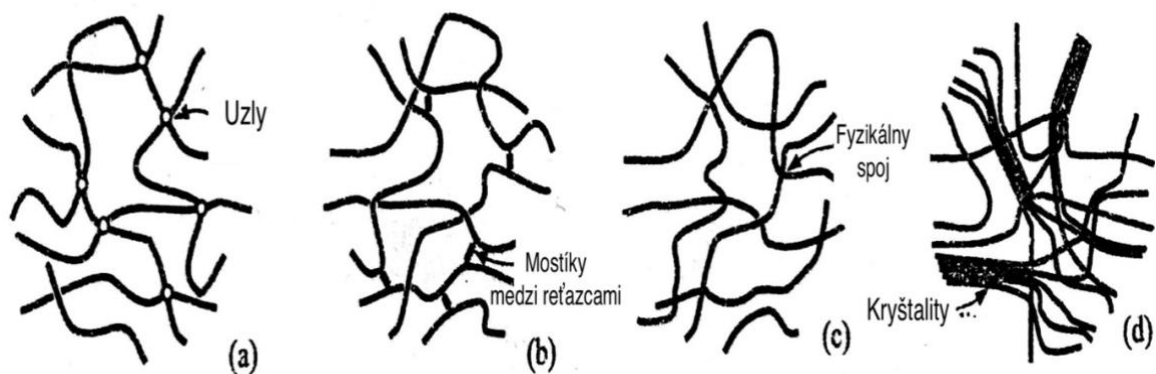
2.4.1 Delenie a vznik gélov

Podľa toho, či gél obsahuje alebo neobsahuje rozpúšťadlo, sa gély delia na lyogély a xerogély. Gély, ktoré po vysušení znižujú svoj objem, nazývame gély reverzibilné. Ich objem je menší zhruba o objem odstráneného rozpúšťadla. Tieto gély potom dávajú kompatné xerogély. Prijímaním disperzného prostredia sú schopné sa opäť vrátiť do pôvodného stavu. Tento proces sa nazýva bobtnanie a je charakteristické pre makromolekulárne gély. Reverzibilné gély môžu tiež vzniknúť geláciou vysokomolekulárnych látok v roztoku, ako bolo

popísané vyššie. Ireverzibilné gély mávajú vo svojom vysušenom stave takmer rovnaký objem ako pôvodný lyogél. Termín lyogél sa používa na označenie pôvodných gélov s disperzným prostredím. Ireverzibilné gély sú však odlišné od pôvodného lyogélu tým, že sú porézne. Keď sa dostanú do opätovného styku s disperzným prostredím, už nie sú schopné vrátiť sa do pôvodného stavu, aj keď sú schopné ešte sorbovať určité množstvo kvapaliny. Ireverzibilné gély teda vznikajú geláciou lyofóbnych solov [2, 21].

2.4.1.1 Gelácia roztokov vysokomolekulárnych látok

Za vhodných podmienok sa v roztoku, medzi molekulami polyméru, môžu tvoriť väzby, ktoré vedú ku vzniku asociátov. V procese gelácie sa postupne vytvára a spevňuje priestorová sieť spojovaním molekulárnych reťazcov v súvislú štruktúru. Pôsobením síl, či už chemických alebo fyzikálnych, sa formujú uzly alebo styčné body. Sú to miesta styku reťazcov vytvárajúce väzbu. Sieťovitú štruktúru utvárajú makromolekuly, ktoré sa spájajú chemickými väzbami. Príkladom môže byť vulkanizácia prírodného, lineárneho kaučuku, kedy sa molekuly pôsobením síry spoja priečnymi väzbami. Takáto štruktúra býva obvykle veľmi pevná a jediným možným spôsobom získania roztoku by bolo odbúranie chemických väzieb. Výsledný produkt by sa však zásadne líšil od pôvodného, pretože sa nedá predpokladať, že by boli zrušené iba väzby, ktoré vznikli geláciou. Uzly sa môžu tvoriť aj pôsobením fyzikálnych síl. Spoje takejto povahy možno vytvoriť asociáciou medzi jednotlivými makromolekulárnymi reťazcami. Počiatkom gelácie tohto typu môže byť napríklad zníženie afinity vysokomolekulárnej látky k rozpúšťadlu. Veľmi častým javom pri gelácii fyzikálnym sieťovaním je usporiadavanie sa jednotlivých interagujúcich častí molekúl rovnobežne. Prechod od najjednoduchších uzlov až po kryštalitu (štruktúry, ktorých styčné body sú orientované rovnobežne), je spojitý. V takomto géli sa nachádzajú oblasti s čiastočne kryštalickou štruktúrou, čiastočne amorfnou. Chovanie sa gélov, ako aj priebeh gelácie ovplyvňuje napríklad koncentrácia, pH či teplota. Všeobecne zvýšenie koncentrácie napomáha procesu gelácie, zvyšuje sa početnosť zrážok molekúl a teda sa zvyšuje aj počet väzieb vytvorených v celom objeme gélu. Vzniku gélu naopak bráni zvýšenie teploty. V roztoku dochádza ku zvýšeniu tepelného pohybu jednotlivých segmentov čoho dôsledkom je zníženie počtu väzieb medzi makromolekulami. Zníženie teploty geláciu podporuje. Gély termoreverzibilné, sú také gély, ktoré po zahriatí prejdú na roztok a po následnom ochladení sa menia opäť na gél. Ako príklad môžu slúžiť agarózové gély. Koloidný roztok tuhne v gél pri teplote, ktorej hovoríme teplota tuhnutia. Naopak teplota, pri ktorej gél úplne prechádza na sol, sa nazýva teplota stekutenia. Proces gelácie je postupný [21].



Obr. 4:(a), (b) Gély vytvorené chemickými väzbami, (c) fyzikálne amorfné uzly, (d) fyzikálne kryštalické uzly [21]

2.4.1.2 Bobtnanie

Keď xerogél pohlcuje nízkomolekulárne rozpúšťadlo, a pritom zväščuje svoj objem, hovoríme o bobtnaní. Vytvorí sa lyogél, v ktorom táto pohltená kvapalina tvorí disperzné prostredie. Bobtnanie môže nastávať samovoľne a iba v reverzibilných géloch. Keď sa bobtnanie zastaví v štádiu lyogélu, teda systém je už v rovnovážnom stave a nedochádza k pohlcovaniu ďalšej kvapaliny, je tento jav nazývaný ako obmedzené bobtnanie. Väčšinou tento dej nastáva, keď je polymér s rozpúšťadlom obmedzene miesiteľný. V sústave sa vytvoria dve fázy, a to fáza nasýteného roztoku polyméru v rozpúšťadle, čo môže byť čisté rozpúšťadlo alebo veľmi zriedené, a nasýtený roztok rozpúšťadla v polymére, čo predstavuje nabobtnaný gél. Existujú systémy, v ktorých sa bobtnanie nezastavuje v stave lyogélu. Hovoríme o neobmedzenom bobtnaní, kde za prítomnosti dostatočného množstva rozpúšťadla a po dosiahnutí určitého nabobtnania dochádza k zániku uzlov. Jednotlivé makromolekuly potom prechádzajú do roztoku. Takéto bobtnanie je pozorovateľné pri látkach, ktoré sa neobmedzene miesia a ďalšími prídavkami rozpúšťadla sa roztok ďalej len riedi. O tom, či bude dochádzať k neobmedzenému bobtnaniu, rozhoduje aj afinita polyméru k rozpúšťadlu, fyzikálne podmienky, ako je tlak či teplota, ale aj štruktúra gélu. Zmenou fyzikálnych podmienok môžeme doceliť aj premenu z bobtnania neobmedzeného na bobtnanie obmedzené [1, 21].

2.4.2 Vlastnosti a využitie gélov

Gély, majú vďaka svojej usporiadanej štruktúre mechanické vlastnosti, ktoré sú charakteristické pre tuhý stav, aj keď je ich prostredie kvapalné. Všeobecne sa ale gély chovajú ako viskoelastické látky. Ako prejav elasticity môže slúžiť aj fakt, že samotný gél odoláva dotykovému napätiu len do určitej hodnoty, do ktorej sa chová ako elasticky tuhé teleso. Táto hodnota závisí na pevnosti a koncentrácii uzlov. Značne elastické sú gély, ktoré obsahujú menší počet väzieb s kovalentnými spojmi. Z toho vyplýva, že čím je v géle viac väzieb medzi reťazcami polyméru, tým menej sa zmení tvar molekuly, a teda sa priestorová sieť stáva rigidnejšou. Určité fyzikálne sieťované gély vykazujú tixotropické vlastnosti. To znamená, že čím dlhšie sa mechanicky pôsobí na dané teleso, tým klesá jeho viskozita. U gélov, či už sú reverzibilné alebo ireverzibilné pozorujeme javy, ktoré sú samovoľné, pretože tieto systémy nie sú v termodynamickej rovnováhe. Pri tomto deji, nazývaným aj starnutie gélu, dochádza k zvýšeniu počtu styčných bodov a zmršťuje sa sieťovitá štruktúra. Časť pôvodnej kvapaliny je potom vytlačovaná gélom von, a tento jav nazývame synerzia.

Táto skutočnosť je pozorovateľná hlavne pri čerstvých géloch [1, 21]. Gély a celkovo proces gelácie je často používaný a aplikovaný v biológii a lekárstve, pretože veľké množstvo rastlín a živočíchov sú tvorené práve gémi. Gelácia vysokomolekulárnych látok predstavuje dôležitý technický proces. Za zmienku stojí napríklad výroba a príprava vlákien, spracovanie koží či aplikácia lepidiel [21].

2.5 Hydrogély

Hydrogély predstavujú veľmi dôležitú skupinu materiálov, aj preto, že mnoho častí ľudského tela ako sú spojivové tkanivo, sklovec alebo rohovka, sú tvorené práve hydrogélmi. Tieto komplexné systémy nachádzajú celý rad aplikácií v mnohých odvetviach ľudskej činnosti, najmä v oblasti starostlivosti o zdravie a kozmetiky. V niektorých prípadoch voda tvorí až 99,9 % celkovej hmotnosti hydrogélu, zatiaľ čo pevného podielu je tu zastúpené len mizivé množstvo cca 0,1 %. Jedná sa teda o disperzné systémy tvorené trojrozmernou polymérnou sieťou, ktorá vytvára súvislú štruktúru, prestupujúcu celým disperzným prostredím. Spojité teda nie je len disperzné prostredie, ale aj disperzný podiel. Dôležitou charakteristikou hydrogélových disperzných sústav je to, že sa jedná o koloidné disperzie. Výraz koloidné znamená, že sa veľkosť disperzných častíc pohybuje v rozmedzí 1 až 500 nm, čiže disperzné častice nemôžeme pozorovať voľným okom [25].

2.5.1 Príprava a využitie hydrogélů

Gély vznikajú procesom zvaným gelácia. Ide o proces, ktorý bol spomenutý a vysvetlený v kapitole 2.4.1.1. Proces gelácie je charakterizovaný tzv. bodom gelácie. Ide o pomerne krátky časový úsek, pri ktorom je vytvorená nekonečná trojrozmerná sieť, čo možno charakterizovať tým, že novovytvorená trojrozmerná sieť má rozmery totožné s makroskopickou gélovou fázou. Procesy, ktorými je možné vytvoriť gél, respektíve hydrogél bol spomenutý v bode 2.4.1 [21, 25].

Hydrogély, ako už bolo spomenuté v predošlých kapitolách, bývajú často využívané v mnohých odvetviach ľudského života. Vďaka ich pozitívnym vlastnostiam sú aplikovateľné v širokom spektre a vo viacerých oblastiach priemyslu. Často sú využívané hlavne v kozmetike, biomedicíne, zdravotníctve, v poľnohospodárstve napríklad pri hnojení či v potravinárstve. Podrobnejšie však stojí za zmienku, že hydrogély sa s obľubou využívajú v tkanivovom inžinierstve. Hlavným dôvodom a aj požiadavkom je ich biokompatibilita a biodegradabilita. Tkanivové inžinierstvo využíva hydrogély vo forme scaffoldov. Hlavným účelom vytvorenia scaffoldu je to, že slúžia ako tzv. lešenie pre rast a proliferáciu buniek. Slúžia teda ako vhodný nosný materiál s optimálnym pH, s vyhovujúcou stavbou či vlhkosťou pre rast nových buniek. Ďalšie prínosné využitie hydrogélů je v cielenej distribúcii liečiv. Princípom kontrolovaného uvoľňovania a jeho hlavnou výhodou je to, že liečivo je schopné prejsť z materiálu, v ktorom je začlenené, do konkrétnej oblasti ľudského tela. Toto pozitívum je často spájané aj s ďalšími benefitmi, kedy môže byť zároveň predĺžená doba pôsobenia liečiva. Hydrogély teda nie sú priamo určené len na distribúciu liečiv ale napomáhajú aj v procese liečby. Uvoľňovanie liečiva z hydrogélu je založené na prestupe účinnej látky do miesta záujmu prostredníctvom difúzie alebo degradáciou hydrogélovej štruktúry, čo vedie k uvoľneniu aktívnej látky z nosiča [26].

2.6 Difúzia a I. Fickov zákon

Difúziu je možno charakterizovať ako samovoľný pohyb častíc v priestore, vďaka neusporiadanému tepelnému Brownovmu pohybu. Pre tento neusporiadaný pohyb je

charakteristické, že sa častice pohybujú v smere z prostredia o vyššej koncentrácii do prostredia o koncentrácii nižšej. Difúzia prebieha v plynách, v kvapalinách a je ju možné pozorovať aj v tuhých látkach. Výsledkom difúzie je, pokiaľ do systému nezasahuje žiadny rušivý vplyv, rovnomerné rozptýlenie látky, ktorú rozpúšťame v rozpúšťadle. To, ako rýchlo sa častice rozdistribuuujú v systéme závisí na veľkosti častíc, teplote a vlastnostiach prostredia. Vo všeobecnosti klesá s rastúcim polomerom častíc. V disperzných koloidných systémoch je tento polomer menší než u klasických analytických. Rýchlosť difúzie je vyjadrovaná pomocou difúzneho toku J_i , ktorý je charakterizovaný ako množstvo difundujúcej zložky i , ktoré za jednotku času prejde jednotkovou plochou kolmou na smer difúzie.

$$J_i = -D \cdot \frac{dc_i}{dx} \quad (1)$$

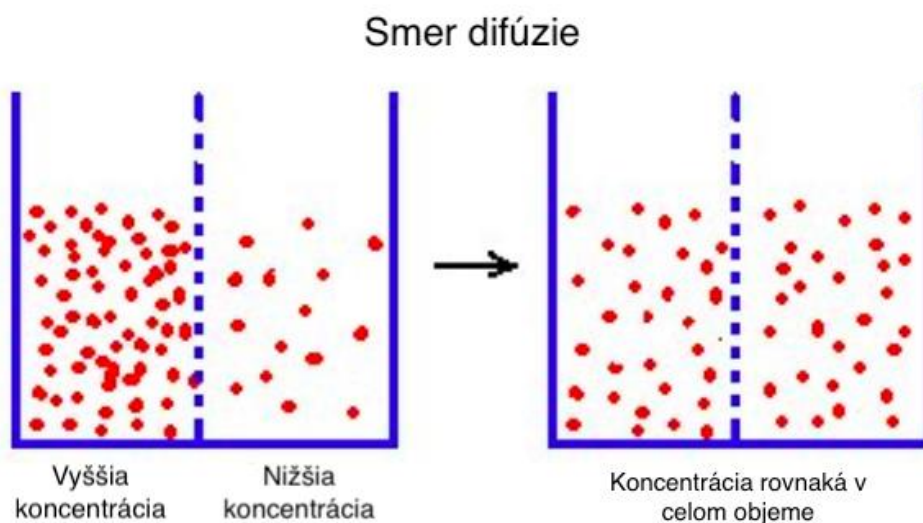
Tento vzťah nazývame I. Fickov zákon, kde D je difúzny koeficient, ktorý závisí na vlastnostiach látky a prostredia. Podiel dc_i/dx je koncentračný gradient (zmena koncentrácie so vzdialenosťou). Pri stacionárnej difúzii sa v ľubovoľnom bode nemení [27].

2.6.1 II. Fickov zákon

II. Fickov zákon sa viaže na nestacionárne difúzie, kedy sa koncentračný gradient s časom mení a difúzny tok sa mení s polohou .

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D \cdot \frac{d^2c_i}{dx^2} \quad (2)$$

Difúzny koeficient sa vo všeobecnosti dá zmerať dvomi spôsobmi. Prvá metóda je založená na rýchlosti prechodu difundujúcej látky poréznou membránou, druhá na voľnej difúzii. Prvá metóda je vhodná na meranie difúzneho koeficientu nízkomolekulárnych látok. Metóda voľnej difúzie funguje tak, že sa roztok s difundujúcou látkou dá do styku s rozpúšťadlom, aby vytvorili ostré koncentračné rozhranie. Takáto sústava musí byť počas určitej doby udržiavaná pri konštantnej teplote, uchránená od otrasov a konvekcie. Zistí sa nové rozdelenie koncentracii a vypočíta sa difúzny koeficient, použitím špecifických tabuliek [2, 27].



Obr. 5: Priebeh difúzie [28]

Pri výpočtoch difúzných koeficientov v géloch (D_g) z koncentrácie rozpustenej látky meniacej sa v čase a jej toku v závislosti na čase, bola použitá nasledujúca rovnica:

$$m = \frac{2\varepsilon c_0}{1 + \varepsilon \sqrt{D_g/D}} \sqrt{\frac{D_g t}{\pi}} \quad (3)$$

V rovnici predstavuje m tok difundujúcej látky udávanej v mol/m², ε je pomer koncentrácie sondy v géli a v roztoku po ustavení rovnováhy, teda ukončenie difúzie. Počiatočná koncentrácia rozpustenej látky je vyjadrená hodnotou c_0 a D je difúzný koeficient rozpustenej látky (sondy) v roztoku [29].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Vďaka pokroku a inováciám v oblasti medicíny mnoho vedeckých tímov po celom svete začalo skúmať a vytvárať možné cesty prípravy nosičov liečiv a liečivých látok, ktoré by sa dali použiť buď v cielej distribúcii pri nádorových ochoreniach alebo vytvorenie takých systémov, ktoré by zlepšovali účinky iných liečiv a pomocných látok. Keďže hovoríme o aplikáciach v medicíne, samotný výber takéhoto nosiča alebo prídavnej látky musí podliehať prísnyim kritériam. Látka by teda mala byť biokompatibilná, biodegradovateľná aj bioaktívna, jej účinok by v tele nemal vyvolávať toxické účinky. Ďalej by táto látka mala viazať liečivo v čo najefektívnejšej forme a zároveň ho uvoľniť v mieste, kde je potrebné. Existuje celá rada nosičov, ktoré boli vyvinuté na báze lipozómov či polymérnych micelách [30].

3.1 Hyaluronan v cielej distribúcii

Vo väčšine prípadov sa vedecké tímy a autori zhodujú na tom, že práve hyaluronan je svojimi vlastnosťami veľmi vhodným zástupcom na pozícii potenciálneho nosiča liečiv. Hyaluronan je telu vlastná látka, polysacharid, obsiahnutý vo väčšine tkanív ľudského tela, a tak spĺňa požiadavku biokompatibility či biodegradability. Dôležitým poznatkom je fakt, že hyaluronan interaguje s receptorom CD44 (receptor nachádzajúci sa na povrchu väčšiny buniek cicavcov), ako signálna molekula pri nádorových ochoreniach. Podľa viacerých štúdií bolo dokázané, že sa hyaluronan akumuluje v mnohých typoch nádorových buniek, a práve to sa využíva v cielej distribúcii [31].

Pre medicínske aplikácie je natívny hyaluronan nepoužiteľný, využíva sa jeho modifikácií. Využívajú sa metódy sieťovania, interakcie s inými látkami alebo vytvorenie jeho derivátov pomocou hydrofóbných funkčných skupín. Modifikovaný hyaluronan na primárnej hydroxylovej skupine bol použitý v práci **K. Iriša a spol.** Štúdia bola zameraná na regeneráciu chrupaviek a skupiny použité na začleňovanie boli akrylát a metakrylát, ktoré umožňujú práve zosieťovanie a vytvorenie hydrogélu. Celkové výsledky a testy ukazovali na sľubnú budúcnosť pripraveného hydrogélu vo využívaní v lekárskom prostredí [32].

O rok na to, v roku 2012, bola skúmaná interakcia polyetylén glykolu (PEG) s diakrylát/tiolovaným hyaluronanom tímom **R. Censiho**. Modifikácia bola vykonaná opäť metódou sieťovania pomocou fotopolymérácie. Sledovalo sa uvoľňovanie proteínov z takto upraveného hyaluronanu. Potvrdilo sa očakávanie, že sa kladne nabité proteíny uvoľňovali rýchlejšie než záporné. Je to vďaka záporným nábojom v štruktúre hyaluronanu. Biologické tkanivá obsahujú enzým hyaluronidázu, ktorá taktiež ovplyvňuje rýchlosť uvoľňovania [33].

V ten istý rok skupina **Y. Taa a spol.** rozbehli pokus, kde sa do modifikovaného hyaluronanu snažili zapuzdriť pomocou micelárnych útvarov, cytostatikum Paclitaxel (PTX). Využitím fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS) sa prišlo na to, že tento nosič je vychytávaný mozgovými tumormi a taktiež je používaný v medicíne [34].

Ako bolo spomenuté, uvoľňovanie aktívnych látok z hyaluronových nosičov ovplyvňuje enzým hyaluronidáza. Z toho vyplýva problém spojený s distribúciou, a to, že sa aktívna látka môže neúmyselne uvoľniť do krvného riečišťa. Touto problematikou sa zaoberali výskumníci **H. Yoona a spol.** v roku 2013. Pod ich vedením boli vyvinuté nanočastice pripravené fotozosieťovaním akrylátových skupín a kyseliny hyalurónovej. Stabilita tohto systému bola väčšia a uvoľňovanie PTX bolo v mieste účinku postupnejšie. Takto pripravený produkt

a jeho namerané dáta poukázali na nádejné využívanie v aplikačných odvetviach medicíny [35].

3.2 Interakcie hyaluronan-tenzid

Hydrogély založené na biopolyméroch resp. polysacharidoch priťahujú čoraz väčší záujem, hlavne v oblasti tkanivového inžinierstva alebo už vyššie spomenutej cielenej distribúcie. Hyaluronan, je sám o sebe vysoko hydrofilný biopolymér s mohutným hydratačným obalom a preto v takomto stave nie je vhodný na distribúciu nepolárnych látok. Mnoho liečív, ktoré sa zdajú byť značne účinné však majú hydrofóbny charakter a preto sa vyvinuli metódy hydrofobizácie hyaluronanu za účelom vytvorenia štruktúr, ktoré by boli schopné solubilizovať nepolárne molekuly. Chemická úprava so sebou nesie aj riziko narušenia biologickej aktivity hyaluronanu, a preto je dôležité aby interakcie medzi hyaluronanom a jeho hydrofobizujúcim partnerom boli poriadne preskúmané. Interakcia tenzidov s hyaluronanom sa zdá byť cestou, ktorá by spĺňala podmienku vytvárania systémov, kde by hyaluronan poskytoval svoje biokompatibilné účinky a micely by slúžili ako solubilizačné oblasti pre nepolárne látky [36].

Posledné roky sú tieto interakcie s obľubou študované a najznámejšia práca tímu **K. Thalberga** skúmala interakcie medzi hyaluronanom sodným a kationovými tenzidmi, ktorých dĺžka reťazcov sa líšila. Tenzidy, ktorých dĺžka reťazcov obsahovala viac ako 10 uhlíkov sa naviazala na hyaluronan ešte pod kritickou micelárnou koncentráciou. Po pridávaní ďalšieho množstva tenzidu sa systém stabilizoval a začali sa tvoriť voľné micely. Tenzidy s kratším uhlíkovým reťazcom tvorili z energetického hľadiska voľné micely a pomocou meraní zistili aj to, že voľné micely tenzidu sú väčšie než micely s naviazaným hyaluronanom. Takisto bolo zistené, že koncentrácia tenzidu ovplyvňuje vzhľad počiatočnej zrazeniny. Vysoké koncentrácie mali za následok vytváranie zrazeniny mliečnej farby, naopak pri nízkych koncentráciách sa tvorili takmer priehľadné zrazeniny. Ďalším zistením bol aj fakt, že lepší priebeh fázovej separácie bol pozorovaný pri nízkomolekulárnom hyaluronane. Interakcie boli skúmané pomocou metód NMR, vodivosti, polarimetrie a solubilizácie farbív [37].

Interakciou polymér tenzid sa zaoberali aj výskumníci tímu **Sauerovej P. a spol.**, kde pozorovali kladne nabitý tenzid a záporne nabitý polymér. Ako tenzidy boli použité karboxypendecínium bromid (Septonex) a cetyltrimetylamónium bromid (CTAB). Takto pripravené systémy boli preštudované z hľadiska cytotoxicity povrchovo aktívnych látok, ktoré by mohli mať rôzne nežiadúce účinky pre rôzne typy buniek. Cytotoxicitu sledovali počas 24 hodín pomocou svetelného mikroskopu [38].

Interakcie s aniónovými a neiónovými tenzidmi a polymérov študovali aj vedci z tímu **D. Yina a spol.**, kedy skúmali aj prídavky ďalších sacharidov [39].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiály

Hyaluronan

LMW Hya (hyaluronan o molekulovej hmotnosti 250–450 kDa),

$M_w = 340$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarža 230215-E1

HMW Hya (hyaluronan o molekulovej hmotnosti 1 400–1 600 kDa),

$M_w = 1\,540$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarža 181214-4-D1

Septonex

$M_w = 422,48$ g.mol⁻¹, šarža 511SEP003

Nílská červeň

CAS: 7385-67-3, Sigma Aldrich s.r.o., čistota $\geq 98,0$ %, $\lambda_{\max} = 553$ nm

Chlorid sodný

NaCl, CAS: 7647-14-5; Penta s.r.o., číslo šarže: 1903200314, čistota $\geq 99,9$ %

Deionizovaná voda

H₂O, Purelab: ELGA

4.2 Použité programy a prístroje

Pripravované hydrogély a ich supernatanty boli premeriavané na dvojlúčovom spektrofotometri Hitachi U-3900. Merala sa absorbancia supernatantov pripravených značených hydrogélou nílskou červeňou pri absorpčnom maxime sondy 553 nm. Boli použité kremenné kyvety s optickou dĺžkou 1 cm. Z hydrogélou boli vytvorené kalibračné sady, z ktorých následne boli vytvorené kalibračné priamky. Pomocou kalibračných priamok a Lambert-Beerovho zákona boli prepočítané koncentrácie sond v jednotlivých roztokoch. Na vyhodnocovanie bol použitý program Microsoft Excel.

4.3 Príprava zásobných roztokov a vzoriek hydrogélou

Všetky zásobné roztoky hyaluronanu a Septonexu boli pripravované vo fyziologickom roztoku NaCl o koncentrácii 0,15 M. Zásobný roztok hyaluronanu bol pripravovaný tzv. mokrou cestou.

4.3.1 Príprava zásobného roztoku NaCl

Na 1 000 ml deionizovanej vody bola použitá navážka NaCl o hmotnosti 8,766 g, ktorá bola následne v tejto vode rozpustená. Roztok sa ďalej uchovával na ďalšie použitie pri laboratórnej teplote.

4.3.2 Príprava zásobného roztoku hyaluronanu

Na prípravu zásobného roztoku hyaluronanu bolo navážené potrebné množstvo polyméru, (výsledná koncentrácia zásobného roztoku 2 hm.%) a následne rozpustené v 0,15 M NaCl. Pripravovaný roztok bol umiestnený na magnetickú miešačku po dobu minimálne 24 hodín. Ďalej boli roztoky uchovávané pre ďalšie použitie v chladničke pri teplote 4 °C.

4.3.3 Príprava zásobného roztoku tenzidu

Na prípravu zásobného roztoku tenzidu Septonexu bolo navážené potrebné množstvo tenzidu, (výsledná koncentrácia zásobného roztoku 200 mM, 100 mM a 50 mM) a následne rozpustené v 0,15 M NaCl. Potom bol roztok umiestnený na magnetickej miešačke po dobu

minimálne 24 hodín. Pripravené zásobné roztoky Septonexu boli uchovávané na ďalšie použitie pri laboratórnej teplote.

4.3.4 Príprava kalibračných roztokov nílskej červene

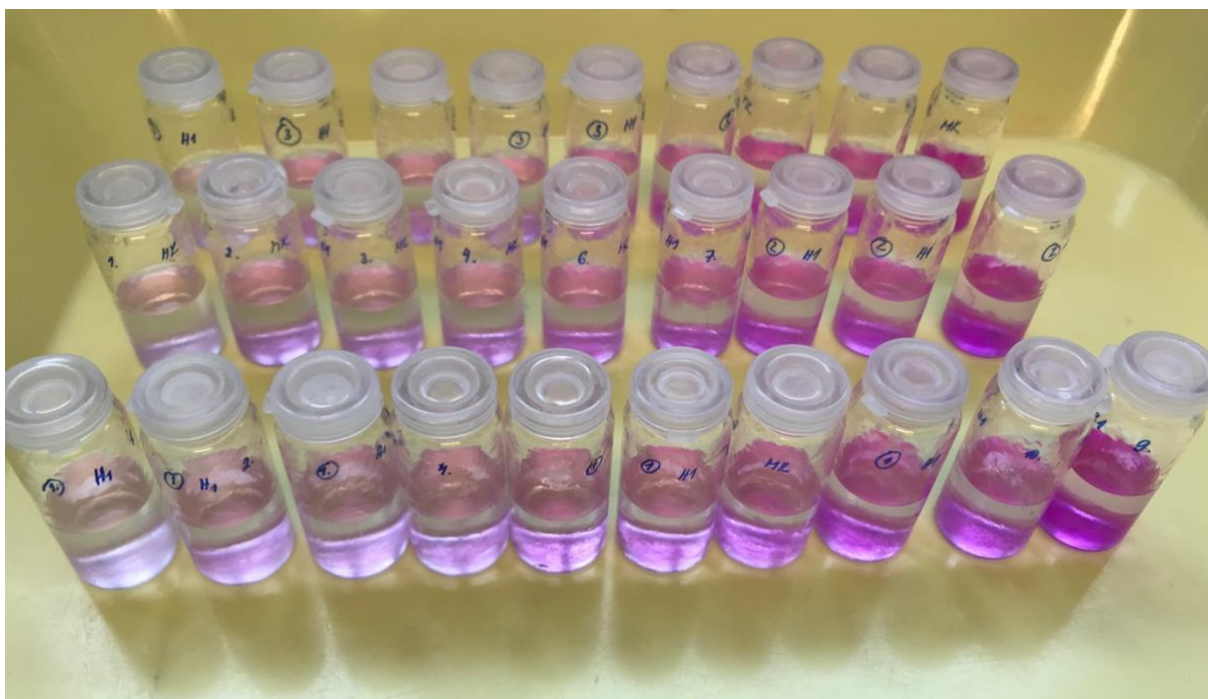
Zásobný roztok NR bol pripravený navážením potrebného množstva NR v suchej práškovej forme a rozpustený v potrebnom množstve acetónu. Pre potreby tejto práce bol používaný zásobný roztok NR o koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ M. Tým, že NR je rozpustná v acetóne, tak sa pre vytvorenie kalibračnej rady najprv napipetoval požadovaný objem NR do vialiek a takto naplnené vialky sa nechali odparovať v digestóriu, až pokým sa nevytvoril farebný film NR na dne vialiek. To signalizovalo odparenie acetónu. Potom sa takto odparená NR zaliala 10 ml tenzidu a pripravené roztoky boli ponechané cez noc do ďalšieho dňa na trepačke, aby došlo k úplnej homogenizácii zmesi. Takto bolo pripravených 10 rôznych roztokov NR v Septonexe o koncentráciách 2; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 a 15 μ M.

4.3.5 Príprava hydrogélů

Všetky hydrogély boli pripravované „mokrou“ cestou. Po úplnom a kvalitnom rozpustení a zmiešaní zásobných roztokov hyaluronanu a Septonexu boli do predom pripravených, čistých a suchých vialiek napipetované 3 ml hyaluronanu a 3 ml tenzidu s nílskou červeňou. Zloženie jednotlivých hydrogélů je uvedené v *tabuľke 1*. Zmes tenzidu a polyméru bola následne pomocou vortexu dôkladne zhomogenizovaná a gély boli ponechané cez noc do ďalšieho dňa na trepačke. Celkovo boli pripravené 3 sady z každého druhu hydrogélů obsahujúce 10 vzoriek o 10 rôznych koncentráciách. Spolu bolo teda pripravených 30 vzoriek z každého druhu hydrogélů. Gély H1 a H2 boli pripravované z vysokomolekulárneho hyaluronanu (HMW Hya), naopak na gély H4 a H5 bol použitý nízkomolekulárny hyaluronan (LMW Hya).

Tabuľka 1: Zloženie hydrogélů a ich značenie

Zloženie hydrogélů HYALURONAN - SEPTONEX				
Koncentrácia zásobného roztoku		Koncentrácia vo vzorku/značenie		
HMW Hya	Septonex	HMW Hya	Septonex	Značenie
2 % hya	200 mM	1 % hya	100 mM	H1
	100 mM		50 mM	H2
	50 mM		25 mM	H3
LMW Hya	Septonex	LMW Hya	Septonex	Značenie
2 % hya	200 mM	1 % hya	100 mM	H4
	100 mM		50 mM	H5
	50 mM		25 mM	H6



Obr. 6: Pripravené 3 sady hydrogélů H1



Obr. 7: Pripravená kalibračná sada hydrogélů H2 obsahujúca 10 rôznych koncentrácií NR v tenzide.

Tabuľka 2 Koncentrácia NR v jednotlivých vzorkách platná pre všetky druhy gélov

Číslo vialky	Koncentrácia NR vo vzorku (μM)
1	2
2	3,5
3	4
4	5
5	6

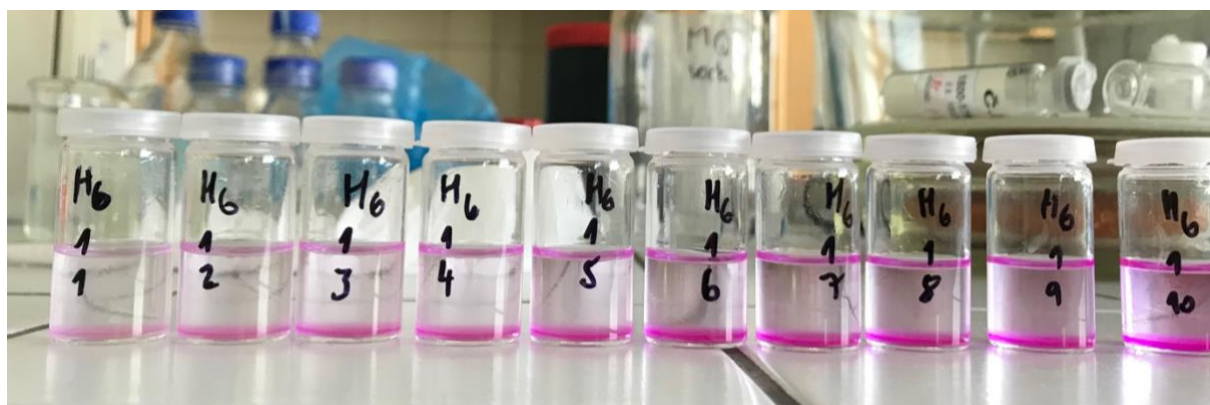
6	7
7	8
8	9
9	10
10	15

4.4 Metódy merania a experimentov

4.4.1 Uvolňovanie sondy z gélov H1, H2, H4 a H5

Na výrobu gélov H1 a H2 bol použitý HMW Hya s nílskou červeňou. Tieto vzorky boli vždy ponechané cez noc na trepačke a nasledujúci deň bola zmeraná absorbanca pôvodných supernatantov z každej sady. Po zmeraní absorbancie bol vždy v prvej sade ponechaný pôvodný supernatant (10 koncentrácií NR), v druhej sade po premeraní absorbancií bol pôvodný supernatant vymenený za 5 ml 0,15 M NaCl. V tretej sade bol pôvodný supernatant vymenený za 5 ml tenzidu. Pre gély H1 sa v tretej sade vymenil pôvodný supernatant za 200 mM Septonex, pre gély H2 100 mM Septonex. Celkovo teda bolo vytvorených 30 vzoriek H1 obsahujúcich v prvej sade 10 vzoriek s pôvodným supernatantom, v druhej sade 10 vzoriek s NaCl a v tretej sade takisto 10 vzoriek so Septonexom o koncentracii 200 mM. Obdobne boli pripravené vzorky pri géloch H2 s rozdielom v tretej sade, kde koncentrácia Septonexu bola 100 mM. Rovnako boli vytvorené aj sady gélov H4 a H5, ktoré boli však pripravené z LMW Hya. Následne boli zmerané absorbancie gélov v určitých časových úsekoch. Prvý deň boli zmerané absorbancie pôvodných gélov s nezamenenými supernatantmi, potom boli zmerané absorbancie gélov po výmene supernatantov po 3 dňoch a po týždni.

Tiež boli pripravené aj gély H3 a H6, no dôsledkom zakalených supernatantov po výrobe gélov však nebolo možné zmerať ich absorbancie. Preto sa tieto gély už ďalej nepoužívali a nemerali. Navyše sa supernatanty nechovali ako kvapaliny (neliali sa), ale mali viskóznejšiu povahu. Pri meraní to spolu so zakalením spôsobovalo aj rozptyl svetla, nie len jeho absorbanciu.



Obr. 8: Pripravená sada gélov H6 s viditeľným zakalením



Obr. 9: Pripravená sada gélov H3, kde je možné vidieť zakalenie vzoriek



Obr. 10: Pripravené vzorky gélu H6, kde vidno viskóznejšiu povahu supernatantov



Obr. 11: Pripravená vzorka gélu H3, s viskóznym supernatantom

4.4.2 Uvoľňovanie sondy z plošného zdroja

Niekoľko experimentov bolo sledovaných s uvoľňovaním sondy NR z plošného zdroja. Do zrezraných kyviet boli prevedené gély H1 a H2 tak, aby v kyvete vytvorili čo najmenej

bublín, následne potom boli ešte kyvety s gélmi centrifugované, aby sa odstránili prípadné bublinky v géle a došlo k zhomogenizovaniu gélu v kyvete. Následne bol pripravený filtračný papier, ktorý mal rozmery kyvety, ponorený do roztoku NR, po vybratí sa papierik nechal voľne odpariť od acetónu a následne bol položený na gél v kyvete. Kyveta bola potom obalená parafilmom a otočila sa hore dnom, aby gél stiekol na papierik a došlo k ich kontaktu.

Na uvoľňovanie z plošného zdroja bola použitá aj mikrotitračná doštička, vyrobená za pomoci kolegov z organickej elektroniky. Bola postavená tak, aby sa na jej bočnú stenu mohla naniesť kvapka NR v acetóne, následne sa kvapka nechala voľne odpariť a do žliabku sa naniesol hyaluronový gél.

Oba experimenty bolo možné analyzovať vizuálne, a to tak, že bolo v oboch prípadoch viditeľné farbené rozhranie a postupnosť ako sa sonda z papieriku/steny žliabku doštičky uvoľňovala do gélu. Oba prípady experimentu však boli nekvantifikovateľné.



Obr. 12: Experiment s plošným uvoľňovaním z mikrotitračnej doštičky

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

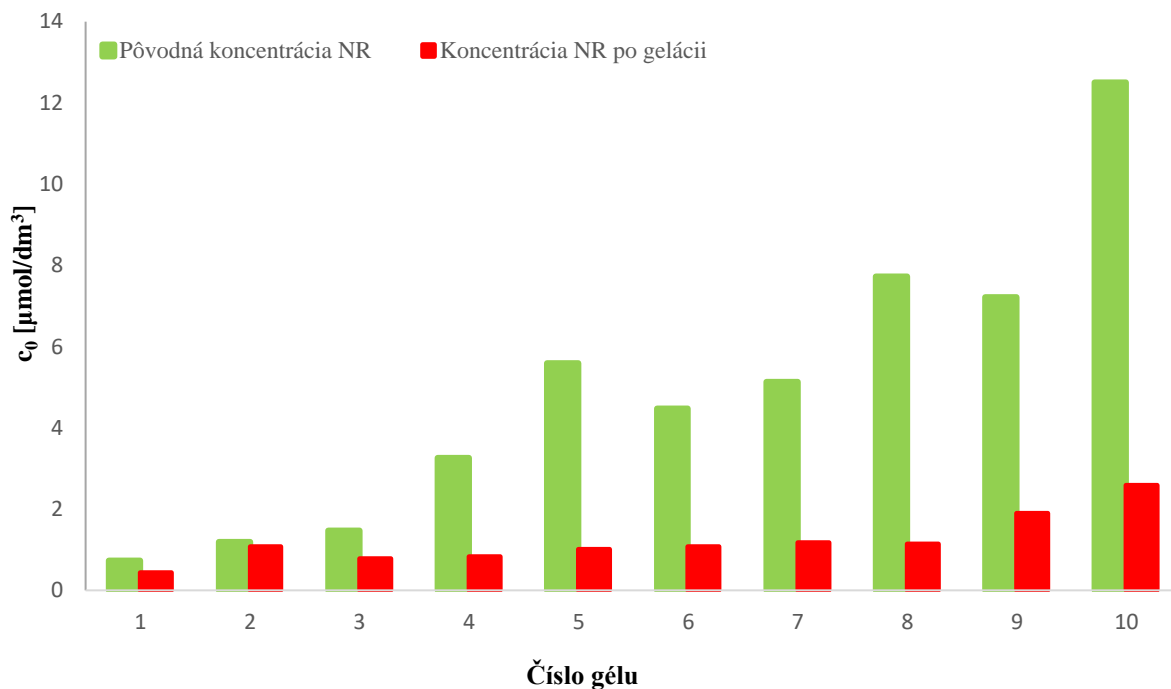
V nasledujúcich kapitolách bude diskutované chovanie sa NR ako sondy a sledovanie jej pohybu v sústave hydrogél – supernatant. Pre pozorovanie transportných vlastností boli použité hyaluronové hydrogély pripravené z LMW a HMW Hya, zosieťované pomocou Septonexu s NR, ktorý bol použitý v rôznych koncentráciach uvedených v *Tabuľka 1*. Spektrofotometricky boli zmerané zmeny absorbancií NR v jednotlivých supernatantoch, následne vytvorené kalibračné priamky, pomocou ktorých boli prepočítané presné koncentrácie NR v roztokoch.

5.1 HMW Hyaluronan s 200 mM Septonexom

Zmiešaním 200 mM Septonexu s NR o rôznych koncentráciach a 2 % hm. HMW Hya bol vytvorený značený hydrogél H1. Na druhý deň, 24 hodín po výrobe gélov bol zmeraný pôvodný supernatant (jeho absorbancia) vo všetkých 3 sadách gélov. Pomocou nej bola vypočítaná pôvodná koncentrácia NR, ktorá slúžila pre ďalšie porovnanie koncentračných zmien v géloch v nasledujúcich dňoch merania.

Tabuľka 3: Označenie jednotlivých gélov H1, pôvodná koncentrácia NR v roztoku Septonexu a koncentrcia NR v supernatante po gelácii

Označenie gélu	Požadovaná koncentrácia NR [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Presná koncentrácia NR [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Koncentrácia NR v supernatante po gelácii [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]
1	2	0,732	0,430
2	3,5	1,193	1,075
3	4	1,465	0,789
4	5	3,255	0,824
5	6	5,587	1,004
6	7	4,475	1,075
7	8	5,126	1,183
8	9	7,730	1,147
9	10	7,215	1,900
10	15	12,503	2,581

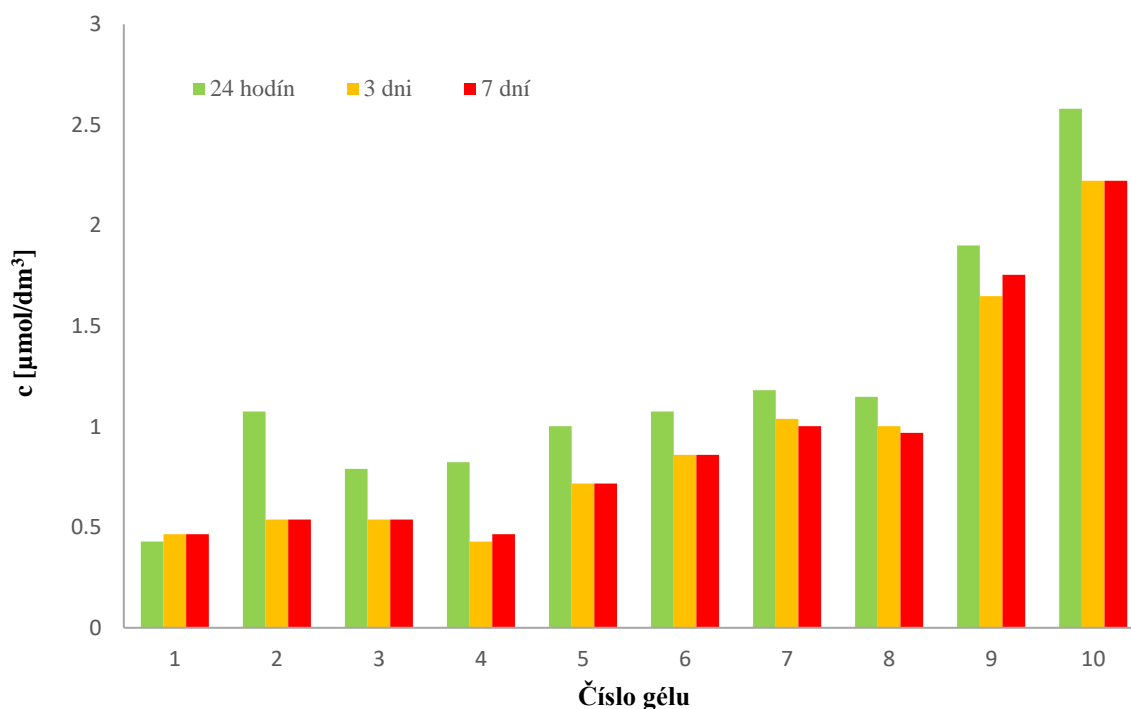


Obr. 13: Porovnanie pôvodnej koncentrácie NR v Septonexe a koncentrácie NR v supernatantoch po gelácii

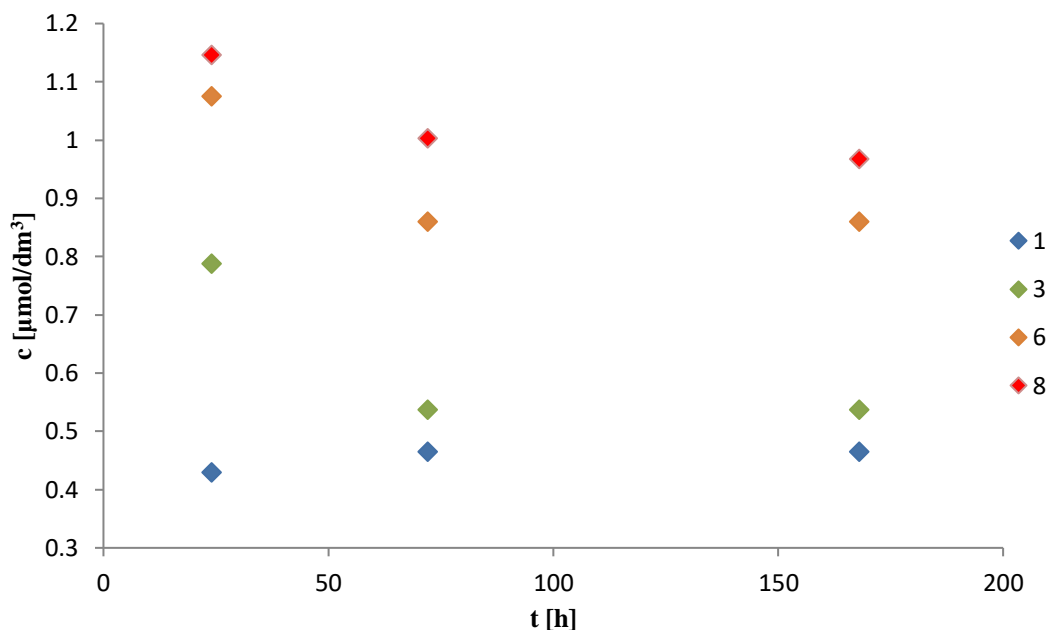
Z dát nameraných po 24 hodinách vyplýva, že s rastúcou koncentráciou NR v Septonexe rastie aj množstvo NR, ktoré gél dokáže naviazať do svojej štruktúry.

5.1.1 H1 s pôvodným supernatantom

V tejto sade gélov bol ponechaný pôvodný supernatant po celú dobu merania. Zásobný roztok hya mal počiatočnú koncentráciu 2 % hm., bol zmiešaný s 200 mM Septonexom s NR o 10 rôznych koncentráciach. Po zmiešaní bola koncentrácia hya v géli 1 % hm. a koncentrácia Septonexu bola taktiež polovičná. Po vytvorení gélov bolo viditeľné zafarbenie gélu do ružova a bezfarebnosť supernatantu. Meranie prebiehalo na spektrofotometri Hitachi U-3900 v časových intervaloch 24 hodín, 3 dni a 7 dní.



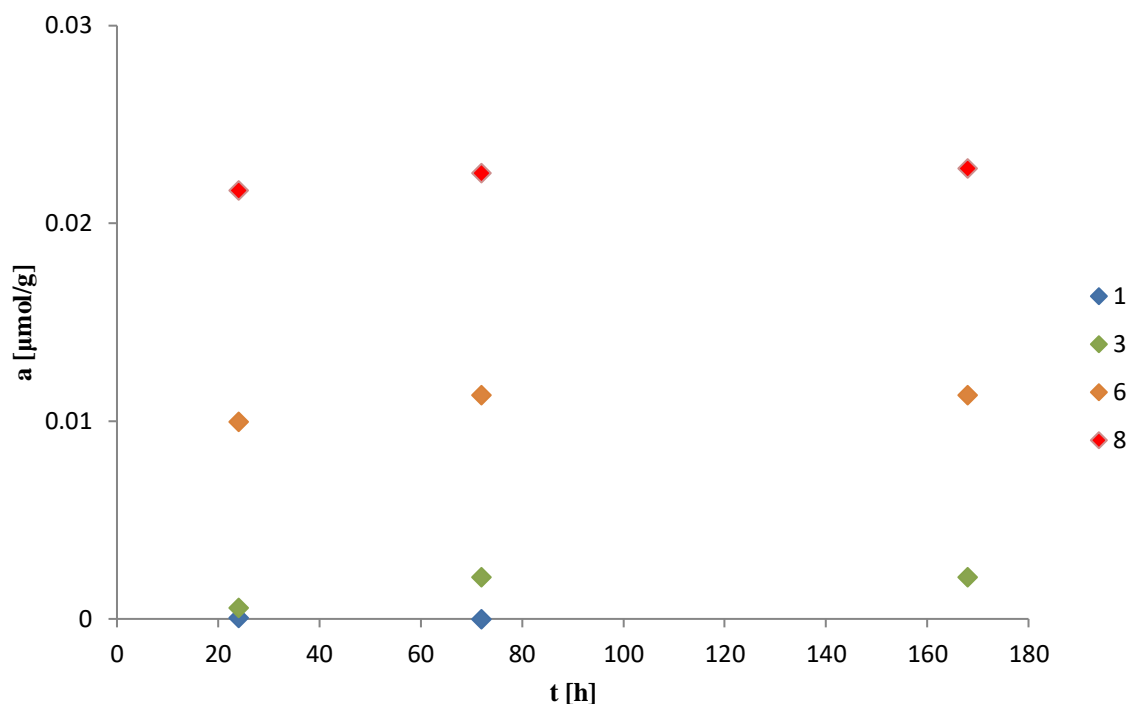
Obr. 14: Zmeny koncentrácií NR v pôvodnom supernatante pri géloch H1 sledované po dobu 7 dní



Obr.15: Závislosť koncentrácie NR v supernatantoch vo vybraných vzorkách v čase

Na Obr. 14 a Obr. 15 môžeme vidieť závislosti koncentrácie NR v supernatantoch v jednotlivých vzorkách v čase. V oboch grafoch môžeme vidieť, že po 24 hodinách je koncentrácia sondy v supernatante najvyššia (takmer vo všetkých vzorkoch, neplatí to len pre vzorku s najnižšou koncentráciou NR, ktorá vďaka tak nízkej koncentrácii NR môže byť zaťažená príliš veľkou chybou, ktorá mohla nastať napr. pri pipetovaní tak malého množstva sondy) a postupne s pribúdajúcim časom, v ktorom boli vzorky sledované, dochádza postupne

k úbytku koncentrácie NR v supernatante, čo pravdepodobne značí, že neustále dochádza k vyrovnávaniu koncentrácií NR medzi supernatatom a gélom. Až po 3 dňoch môžeme vidieť, že transport molekúl sondy medzi supernatantom a gélom sa ustálil, lebo rozdiel v koncentráciách NR v supernatantoch po 3 a po 7 dňoch už nie je takmer žiaden.

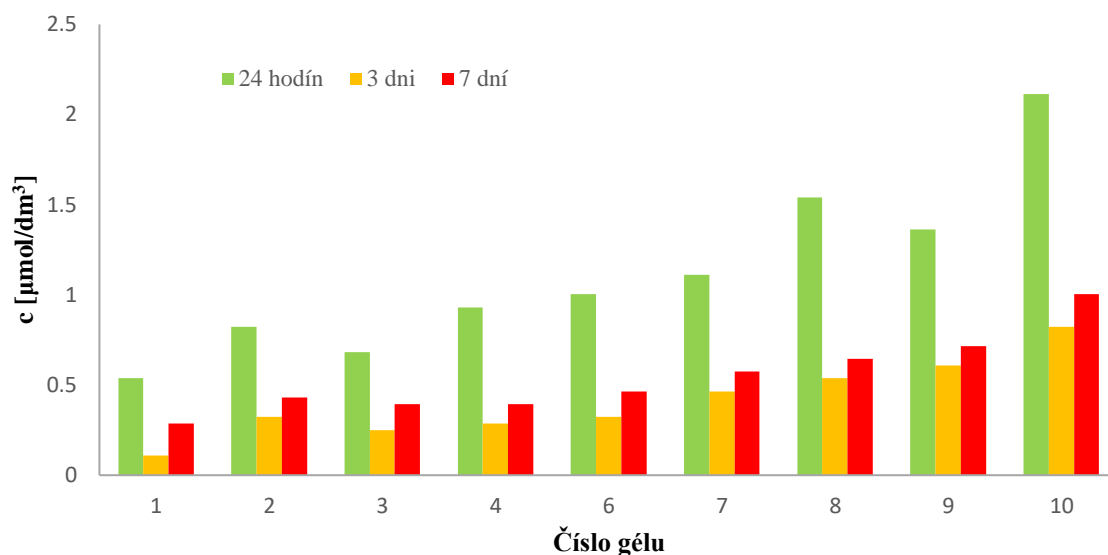


Obr. 16: Vybrané gély a množstvo naviazanej NR v géli H1 v závislosti na čase

Na Obr. 16 môžeme vidieť závislosť množstva naviazanej sondy NR do štruktúry gélu v čase. Tento graf potvrdzuje, ako už aj bolo spomínané, že so zvyšujúcou sa koncentráciou sondy v roztoku tenzidu, sa zvyšuje aj množstvo sondy, ktoré je schopné sa naviazať do štruktúry gélu. To môže byť spôsobené pravdepodobne tým, že pri použití nízkej koncentrácie NR zostáva v géle ešte mnoho voľných miest, na ktoré by sa potenciálne mohli naviazať ďalšie molekuly sondy a pri použití vyššej koncentrácie sondy sú tieto miesta postupne obsadzované.

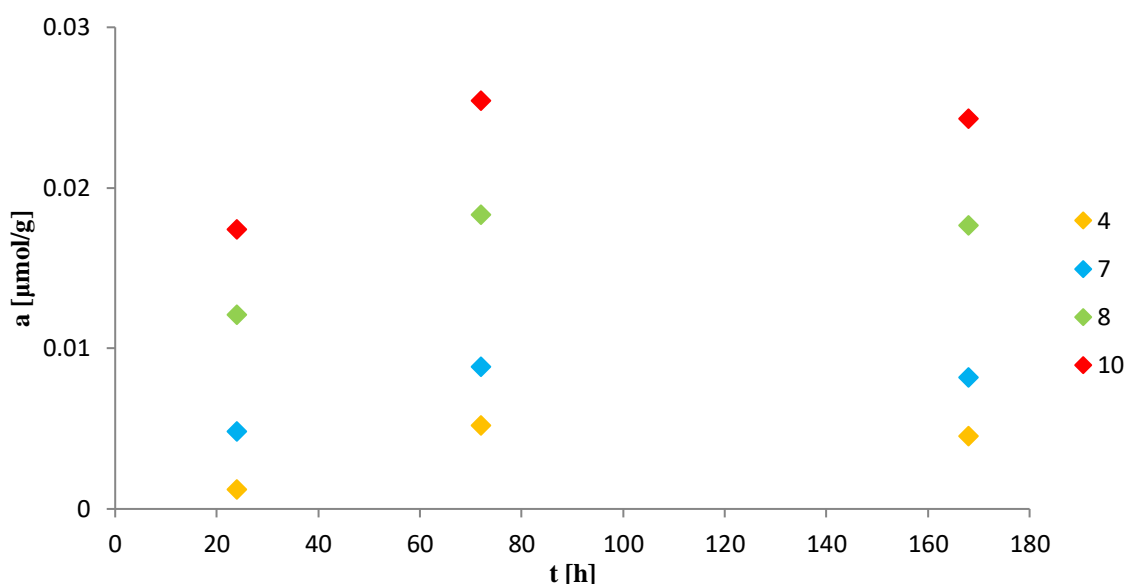
5.1.2 H1 s vymeneným supernatantom za NaCl

Aby bolo pozorovateľné chovanie sa NR ako sondy, v druhej sade gélov H1 bol pôvodný supernatant (po zmeraní absorbancii v jednotlivých vzorkách po prvom dni) opatrne odliaty a vymenený za 5 ml 0,15 M NaCl. Ďalšie meranie po 3 a 7 dňoch od výroby gélu bolo vykonané už so zameneným supernatantom.



Obr.17: Zmeny koncentrácií NR vo vymenených supernatantoch za 0,15 M NaCl pri géloch H1 sledované po dobu 7 dní

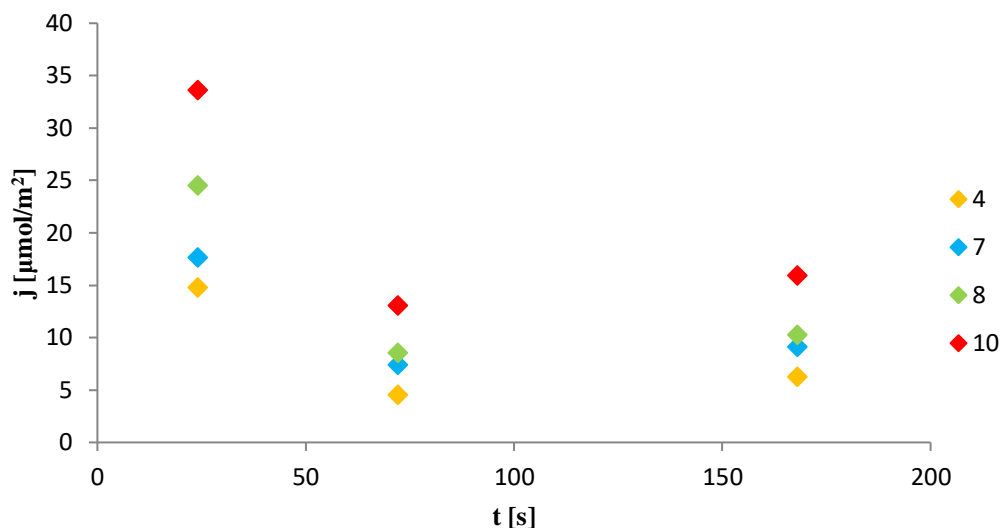
Z Obr. 17 je patrné, že pred výmenou pôvodného supernatantu je koncentrácia NR v supernatantoch vyššia, ako po výmene za 0,15 M NaCl, čo je logické, keďže časť NR zostala v pôvodnom supernatante, ktorý bol zo vzoriek odliaty preč a vymenený za roztok NaCl. Nasledujúci týždeň bol sledovaný prestup sondy z gélu do nového „supernatantu“, ktorým bol roztok NaCl. Z grafu môžeme vidieť, že po týždni je množstvo sondy, ktoré sa z gélu uvoľnilo vyššie než po 3 dňoch, z čoho teda môžeme usudzovať, že ani po týždni nedošlo k vyrovnaní koncentrácií voľných molekúl NR medzi gélom a supernatatom. Difúzia ale stále pokračovala, avšak bola spomalená, čo bolo spôsobené tým, že sa koncentrácia sondy v oboch prostrediach vyrovnávala.



Obr. 18: Naviazané množstvo NR vo vybraných géloch v závislosti na čase

Z obr. 18 vyplýva, že čím bola vyššia pôvodná koncentrácia NR, tým viac sa jej dokázalo naviazať do gélu. Z nameraných a vypočítaných výsledkov uvedených v tomto grafe je vidieť,

že koncentrácie sondy v géloch po 3 dňoch sú vyššie než po jednom týždni. Toto je spôsobené postupným uvoľňovaním sondy z gélu do nového supernatantu z dôvodu vyrovnávania koncentrácií sondy medzi oboma prostrediami. Aj keď sa jedná iba o malé koncentrácie. Tieto výsledky korelujú/korešpondujú aj s výsledkami uvedenými v predošlom grafe.

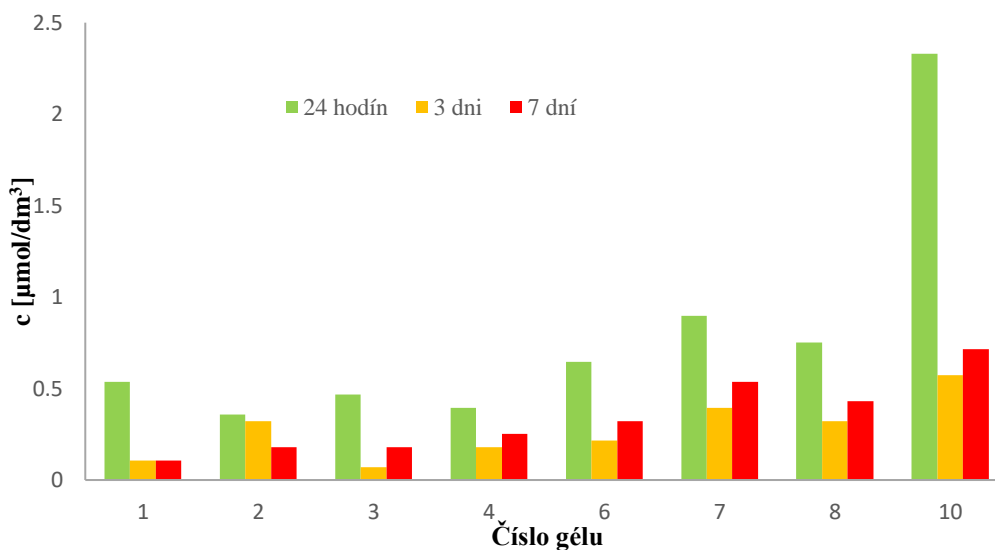


Obr. 19: Tok sondy NR vo vybraných supernatantoch v závislosti na čase

Obr. 19 naznačuje tok sondy. Po výmene supernatantu bolo uvoľňovanie sa sondy pomalšie. Je to z toho dôvodu, že roztok NaCl neobsahuje žiadne micely, do ktorých by sa mohla NR z gélu uvoľňovať. Uvoľňovanie však po treťom dni napriek tomu pokračovalo, pretože NR je sonda, ktorá je do určitej miery rozpustná aj vo vodnom prostredí, preto bolo ešte určité množstvo sondy z gélu uvoľnené do roztoku.

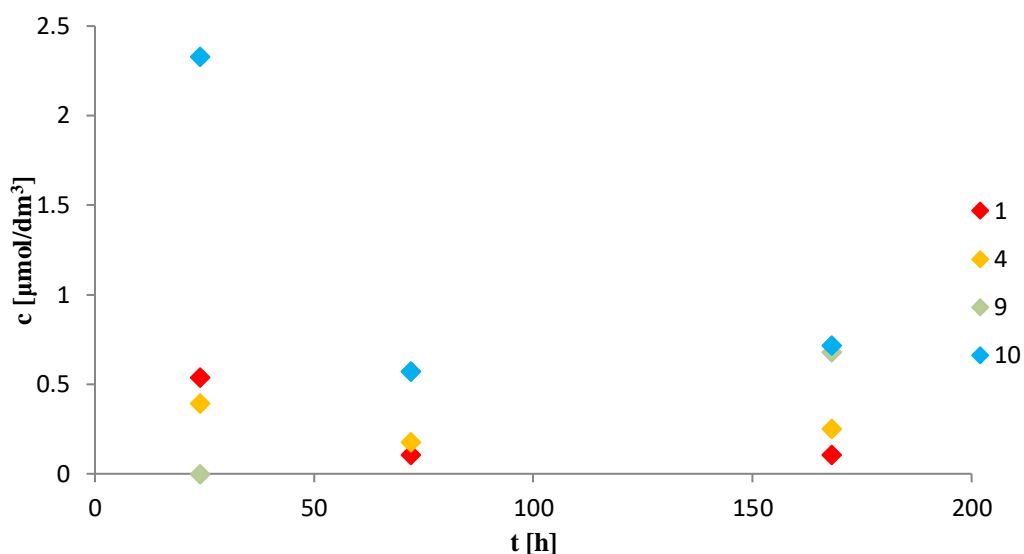
5.1.3 H1 s vymeneným supernatantom za Septonex

V tretej sade bol za pôvodný supernatant vymenený 200 mM Septonex. Absorbancia bola ďalej v treťom dni a po týždni zmeraná už s týmto zameneným supernatantom.

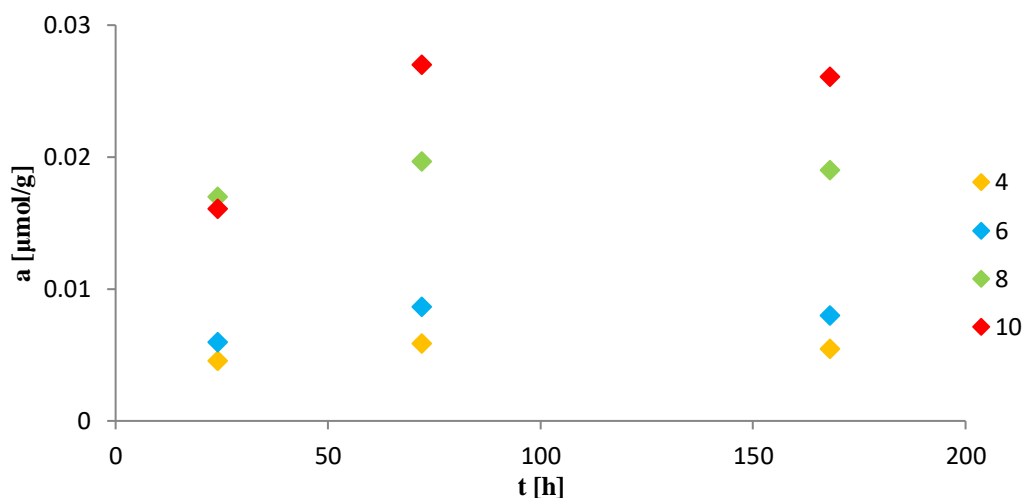


Obr. 20: Zmeny koncentrácií NR vo vymenených supernatantoch za Septonex pri géloch H1 sledované po dobu 7 dní

Vo všeobecnosti sa dá povedať, že sa uvoľňovanie s vymeneným supernatantom za Septonex, v porovnaní s vymeneným NaCl zvýšilo. Je to viditeľné hlavne po siedmom dni od prípravy gélu. Prvé dva vzorky by mali obsahovať najmenšiu počiatočnú koncentráciu NR (avšak vypočítané presné hodnoty v zelenom stĺpci najmä gélu č. 1 tomu neodpovedajú), preto je pravdepodobné, že namerané hodnoty sú zaťažené veľkou chybou. Pre takéto nižšie počiatočné koncentrácie by na meranie bolo vhodné použiť iného prístroja, napríklad fluorešcenčnej korelačnej spektroskopie (FCS). Z grafu na Obr. 20 je ďalej vidieť, že u ostatných vzoriek v priebehu času dochádzalo k postupnému uvoľňovaniu sondy z gélu do supernatantu a ani po týždni ešte neboli koncentrácie sond v oboch prostrediach vyrovnané. Môžeme však vidieť, že po týždni sa už do nového supernatantu uvoľnila viac ako polovica množstva sondy v porovnaní s pôvodným supernatantom (v prevažnej väčšine vzorkov).



Obr. 21: Vybrané gély H1 so zameneným supernatantom (Septonex) a závislosť koncentrácie NR v supernatante v čase



Obr. 22: Vybrané gély H1 so zameneným supernatantom za Septonex, naviazané množstvo NR v géli v závislosti na čase

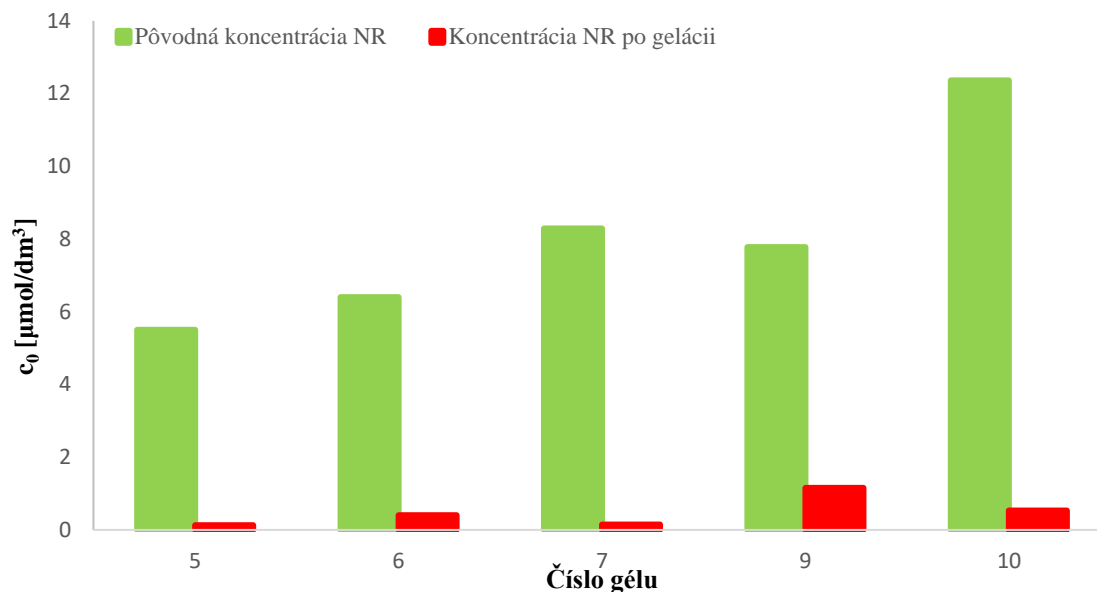
Po výmene supernatantu za Septonex sa zvýšila aj rýchlosť difúzie, zvýšenie koncentrácie NR v supernatantoch. Pri výrobe gélu sa časť micel zo Septonexu „využije“ na jeho vytvorenie. To odpovedá aj zníženiu koncentrácie pripraveného Septonexu z 200 mM na 100 mM (koncentrácia v géli). Po výmene supernatantu je gél „obohatený“ novými micelami z pridaného 200 mM Septonexu, čo vplýva aj na rýchlosť difúzie a uvoľňovania sa sondy z gélu do supernatantu, pretože v novom „supernatante“ sa znova naskytujú voľné väzbové miesta v micelách pre molekuly sondy, a tým pádom opäť dochádza k vyrovnávaniu koncentrácií medzi týmito prostrediami. Túto skutočnosť potvrdzujú aj grafy na Obr. 21 a Obr. 22, kedy rýchlosť difúzie po výmene pôvodného supernatantu za Septonex vzrastie a zvýši sa koncentrácia sondy v supernatante (viď výsledky po 3 dňoch). Po týždni sa však rýchlosť difúzie spomaľuje a vo vzorkách sa znižuje množstvo vymenených molekúl sondy medzi géľmi a supernatantmi.

5.2 HMW Hyaluronan so 100 mM Septonexom

Obdobne ako pri príprave gélov H1 boli pripravené aj gély zmiešaním hyaluronanu o koncentrácii 2 % hm. so 100 mM Septonexom s NR o 10 rôznych koncentráciách. Vytvorili sa značené gély H2, ktorých absorbancie supernatantov boli zmerané po 24, 72 a 168 hodinách od prípravy gélu. V druhej a tretej sade gélov bol po zmeraní absorbancie po 24 hodinách od prípravy gélu vymenený supernatant, v druhej sade za 0,15 M NaCl, v tretej sade za 100 mM Septonex. Sledovali sa účinky výmeny supernatantov na uvoľňovanie NR z gélu do supernatantu a naopak.

Tabuľka 4: Označenie jednotlivých vybraných gélov H2, pôvodná koncentrácia NR v roztoku Septonexu a koncentrácia NR v supernatante po gelácii

Označenie gélu	Požadovaná koncentrácia NR [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Presná koncentrácia NR [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Koncentrácia NR v supernatante po gelácii [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]
5	6	5,506	0,125
6	7	6,401	0,405
7	8	8,299	0,156
9	10	7,784	1,153
10	15	12,368	0,530

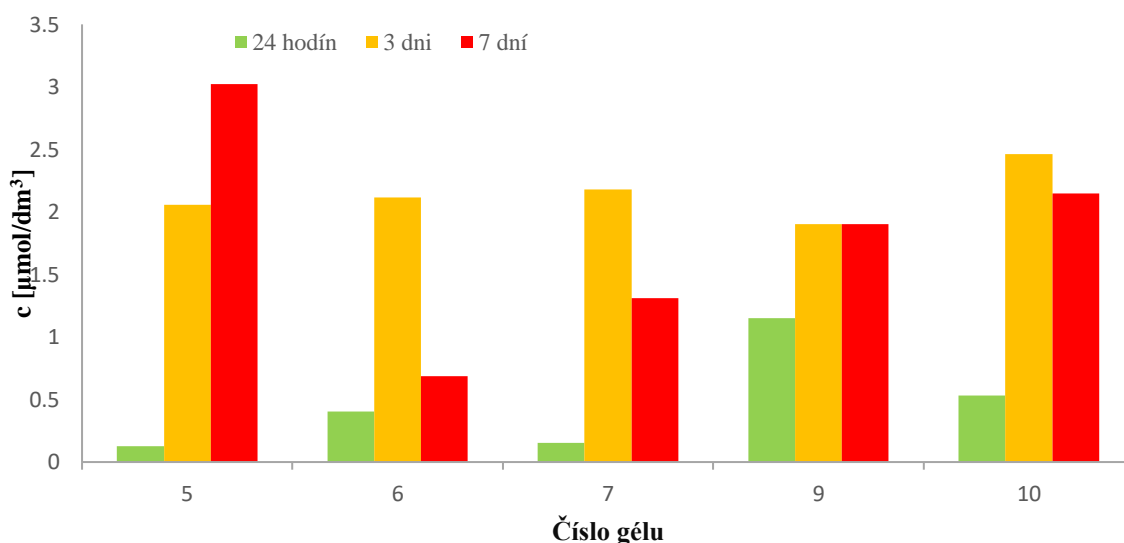


Obr. 23: Porovnanie pôvodnej koncentrácie NR v Septonexe a koncentrácie NR v supernatantoch po gelácii v géloch H2

Pri meraní gélov č. 1, 2, 3, 4 a 8 a následnom vyhodnocovaní boli výsledky zaťažené veľkou chybou, nie sú reprodukovateľné a preto ani nie sú použité a zahrnuté v tabuľke č. 4. a obr. 23. Z ostatných dát je viditeľné, že pôvodná koncentrácia sondy sa po gelácii v supernatante výrazne znížila. Takmer celá sonda bola zakonzentrovaná do micel, ktoré sa spotrebovali na tvorbu gélu.

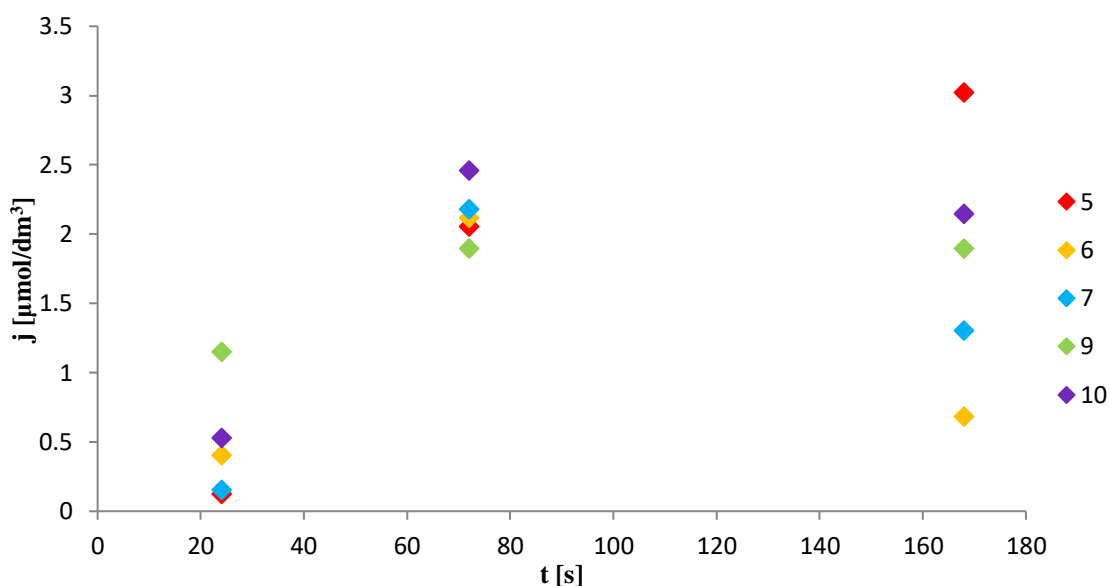
5.2.1 H2 s pôvodným supernatantom

V prvej sade gélov H2 bol ponechaný pôvodný supernatant počas celej doby merania. Boli zmerané absorbancie jednotlivých vzoriek so zvyšujúcou sa koncentráciou NR v Septonexe. Meranie prebehlo po 24 hodinách od výroby gélu, ďalšie po troch dňoch a posledné po týždni od vytvorenia gélu.

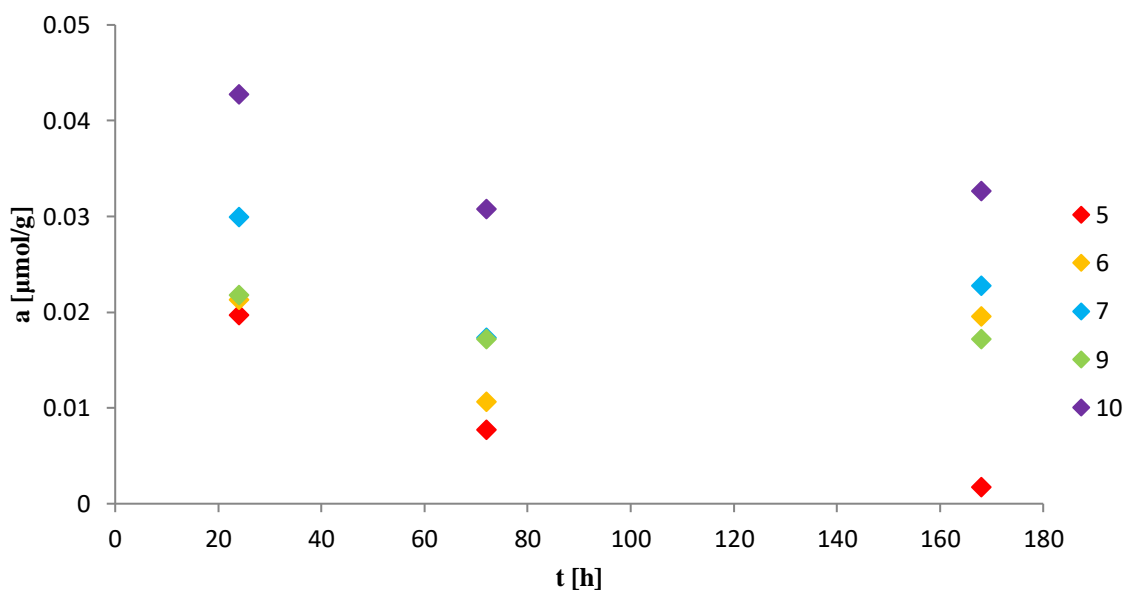


Obr. 24: Vybrané zmeny koncentrácií NR v pôvodných supernatantoch pri géloch H2 sledované po dobu 7 dní

Po 24 hodinách je z obrázku č. 24 viditeľné, že obsah NR v supernatantoch je v porovnaní oproti tretiemu a siedmemu dňu podstatne nižší. Tento výsledok sa dá vysvetliť tým, že 24 hodín od prípravy gélov ešte neboli koncentrácie sondy v oboch prostrediach ustálené a aj naďalej dochádzalo k difúzii. Z grafu je vidieť, že vo väčšine vzorkov je po 3 dňoch nameraná najvyššia koncentrácia sondy, ktorá sa po týždni opäť znižuje. Toto sa dá vysvetliť tak, že po 3 dňoch následne dochádza k opätovnému prestupu sondy zo supernatantu do gélu a jej zakonzentrovávanie sa v štruktúre gélu. Rovnováha v tomto systéme však ešte nebola ustálená, pre dosiahnutie reprodukovateľnejších výsledkov, by bolo potrebné zmerať vzorky ešte v ďalších časových intervaloch.



Obr. 25: Tok sondy NR vo vybraných supernatantoch v závislosti na čase

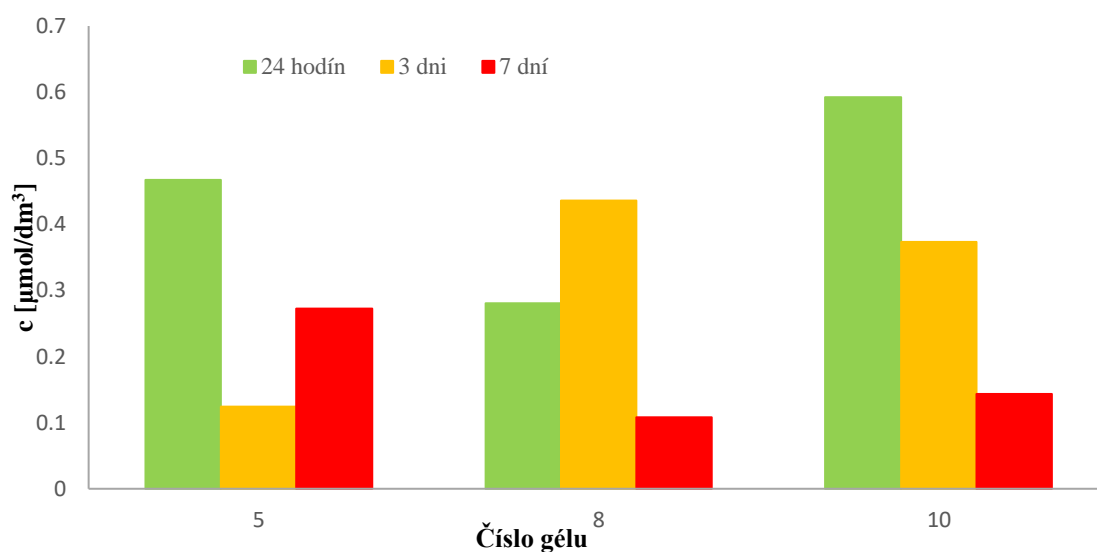


Obr. 26: Vybrané gély H2 s pôvodným supernatantom, naviazané množstvo NR v závislosti na čase.

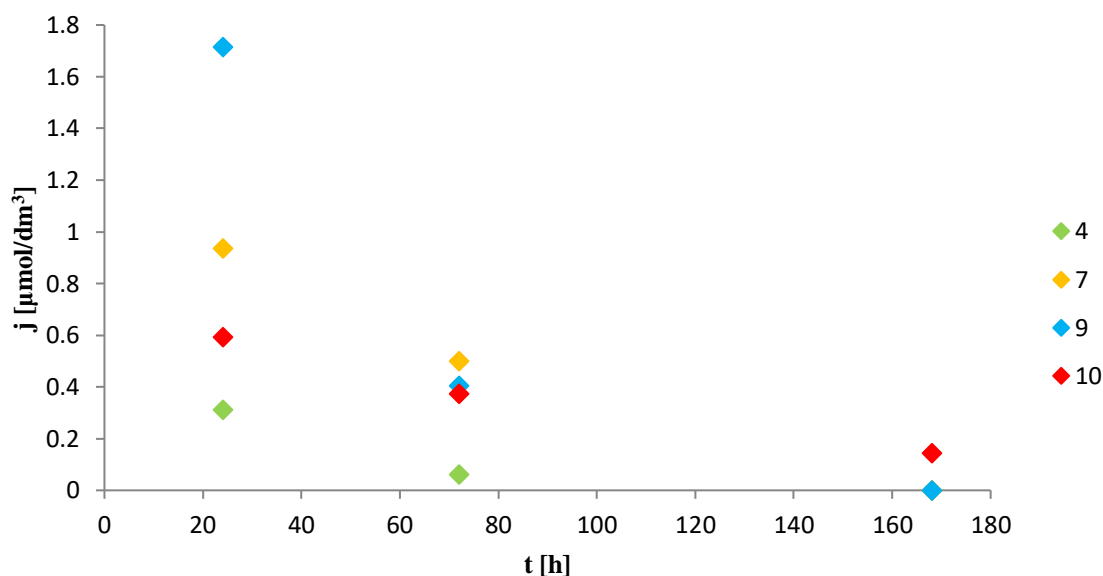
Obrázky č. 25 a 26 znázorňujú tok sondy v pôvodných supernatantoch a naviazanie sa sondy NR do gélu. Správanie sa sondy v supernatantoch a géloch v tomto časovom intervale je kolísavé. Pre reprodukovateľnejšie výsledky by bolo potrebné zmerať pripravené vzorky ešte v ďalších časových intervaloch, aby bolo viditeľné ustálenie rovnováhy systému.

5.2.2 H2 s vymeneným supernatantom za NaCl

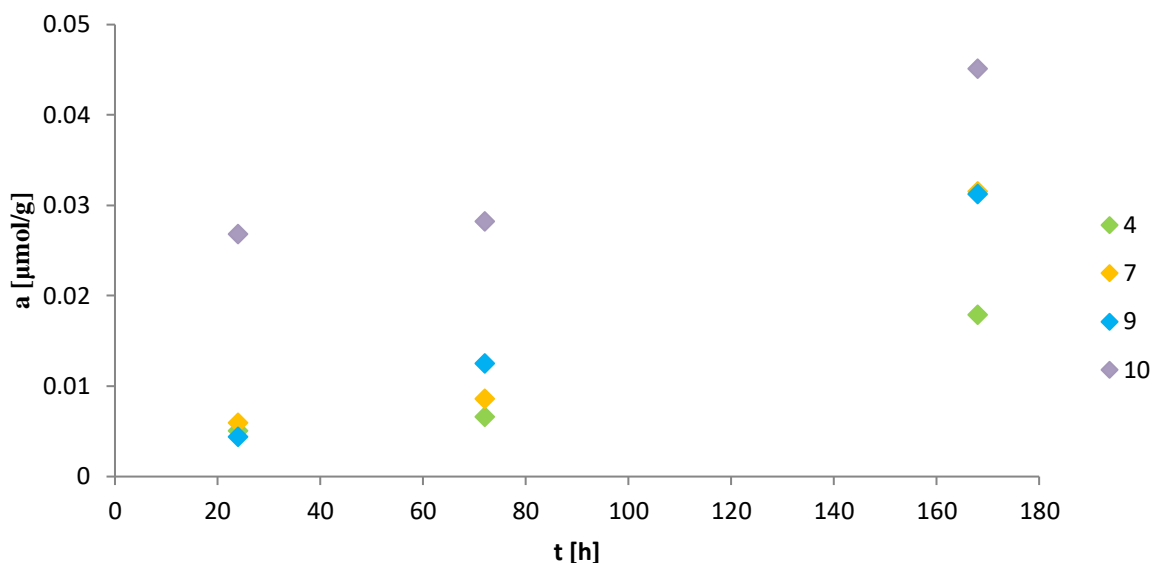
V druhej sade vzorkov gélu H2 bol pôvodný supernatant opatrne vyliaty a zamenený za 5 ml 0,15 M roztoku NaCl. Bol sledovaný priebeh uvoľňovania sa a viazania sa sondy v taktomto systéme do nového „supernatantu“. Absorbancie boli zmerané v nasledujúcich časových intervaloch: 24 hodín, 3 dni a 7 dní.



Obr. 27: Zmeny koncentrácií NR v zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl pri géloch H2 sledované po dobu 7 dní



Obr. 28: Tok sondy NR vo vybraných zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl v závislosti na čase

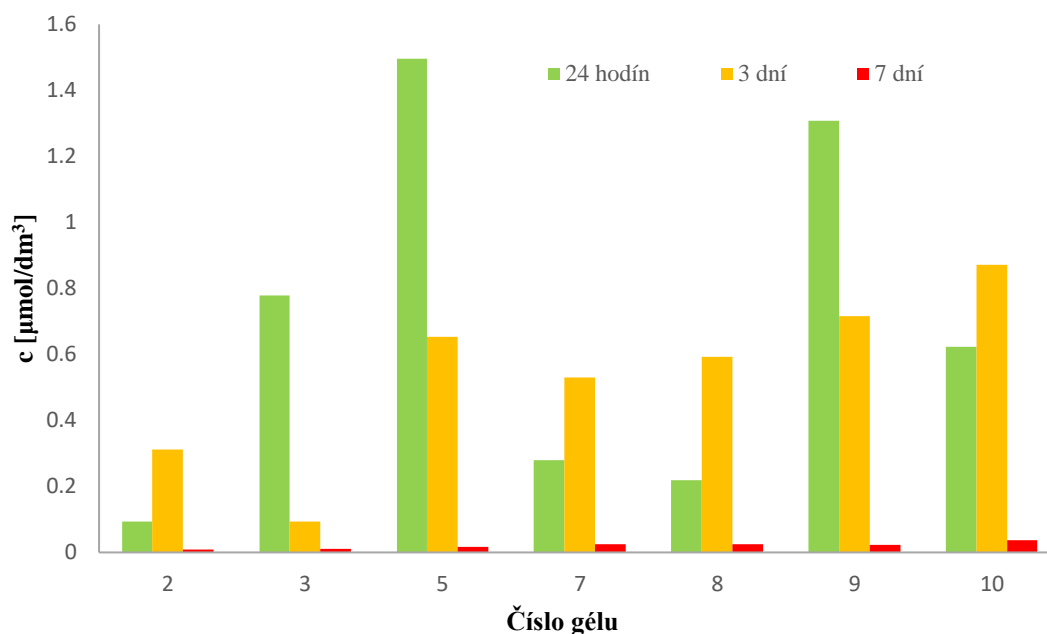


Obr.29: Vybrané gély H2 so zameneným supernatantom za 0,15 M NaCl, naviazané množstvo NR v závislosti na čase

Obrázky č. 27, 28 a 29 popisujú chovanie sa sondy v zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl v závislosti na čase. Obrázok č. 27 naznačuje pokles a nárast koncentrácie sondy v supernatantoch po dobe 3 a 7 dní. Všeobecne po zmeraní a vyhodnotení dát sa 0,15 M roztok NaCl javí ako prostredie, do ktorého sa veľa sondy NR z gélu neuvolňuje. Je to možné vysvetliť aj tým, že po zliatí bolo množstvo NR obsiahnutej v Septonexe „odobraté“, (určité množstvo NR v Septonexe zas bolo spotrebované na tvorbu gélu). Po následnom doplnení roztoku NaCl sa tak „zbytok“ NR (obsiahnutý v géli) nemal kde uvoľňovať, roztok NaCl neobsahuje micely, do ktorých by sa sonda mohla naviazať resp. uvoľniť z gélu. Na Obr.29 však vidíme, že malé množstvo sondy sa do nového supernatantu predsa len uvoľňuje (viď rozdiel po 3 dňoch a po týždni). A dá sa povedať, že ešte ani po týždni nie je koncentrácia sondy medzi prostrediami vyrovnaná u všetkých vzorkov, aj keď rýchlosť difúzie je značne nižšia než po výmene supernatantu (viď Obr. 28).

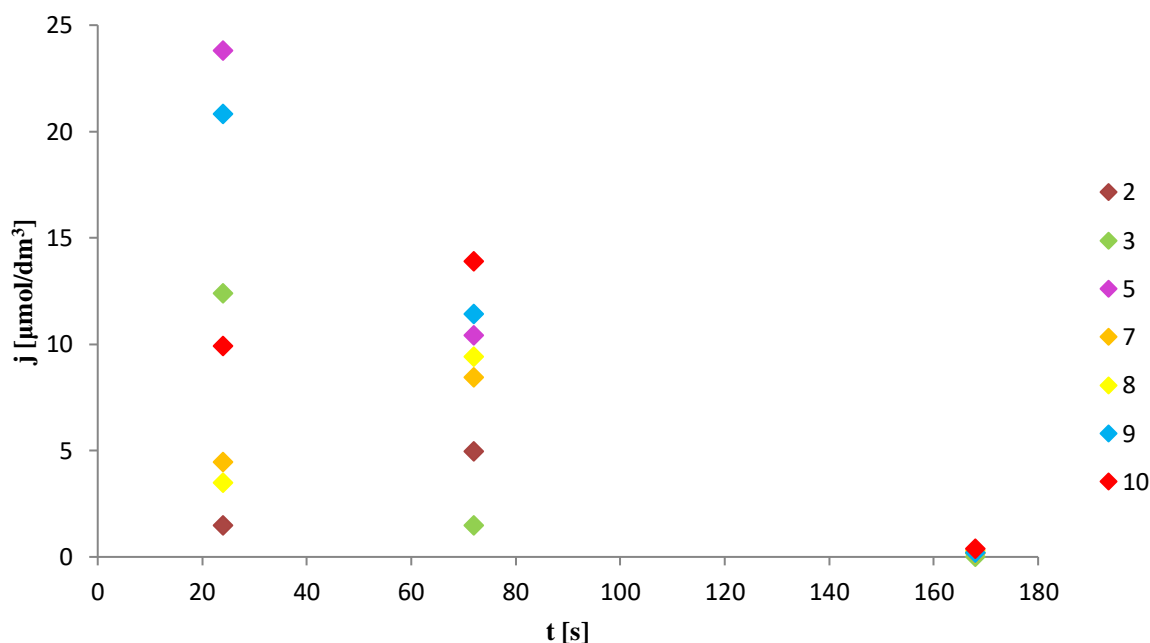
5.2.3 H2 s vymeneným supernatantom za Septonex

Tretia sada gélov H2 sledovala uvoľňovanie a viazanie sa sondy vo vymenenom pôvodnom supernatante za 5 ml 100 mM Septonexu. Absorbancie boli zmerané v obdobných časových intervaloch ako predošlé sady vzoriek gélov H2.

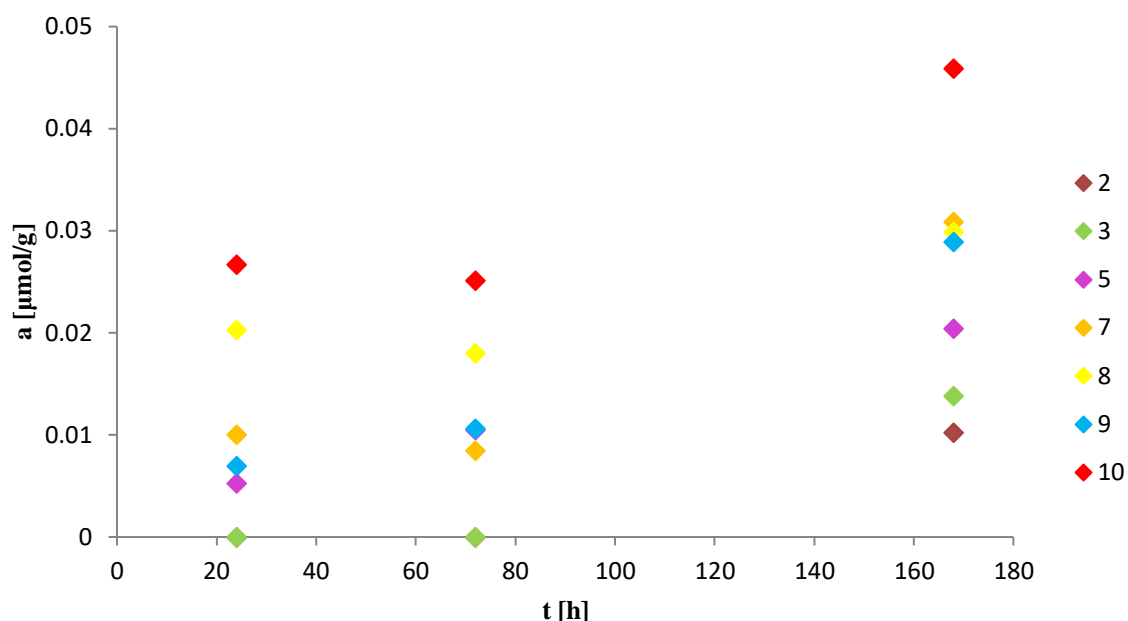


Obr. 30: Zmeny koncentrácie NR v zamenených supernatantoch za 100 mM Septonex pri géloch H2 sledované po dobu 7 dní

Z obrázku č. 30 je patrné, že po výmene pôvodného supernatantu za 100 mM Septonex došlo ku zvýšeniu koncentrácie sondy v supernatante veľmi výrazne (sonda sa uvoľnila z pripraveného značeného gélu), po týždni však obrázok ukazuje, že sa koncentrácia NR vo vymenenom supernatate rapídne znížila u všetkých vzoriek. Sonda sa zakonzentrovala naspäť do gélu.



Obr. 31: Tok sondy NR vo vybraných zamenených supernatantoch za 100 mM Septonex v závislosti na čase



Obr. 32: Vybrané gély H2 so zameneným supernatantom 100 mM Septonexu, naviazané množstvo NR v závislosti na čase

Obrázky č. 31 a č. 32 znázorňujú tok sondy v supernatantoch a naviazané množstvo sondy v géloch v časovom intervale. Chovanie sa sondy korešponduje s obrázkom č. 30. Môžeme vidieť, že tok sondy v supernatante po 7 dňoch veľmi klesol, čo by vypovedalo o vyrovnaní koncentrácií sondy medzi prostrediami vo vzorkoch a zároveň by to odpovedalo zvýšeniu naviazaného množstva NR v jednotlivých géloch po týchto 7 dňoch. Zaujímavý je však fakt, že po 7 dňoch sa takmer všetka sonda naviazala do gélov. Dôvodom môže byť napríklad to, že táto koncentrácia je akousi „ideálnou“ koncentráciou pre dané vzorky. Každopádne by bolo vhodné podrobiť tieto vzorky ďalším experimentom.

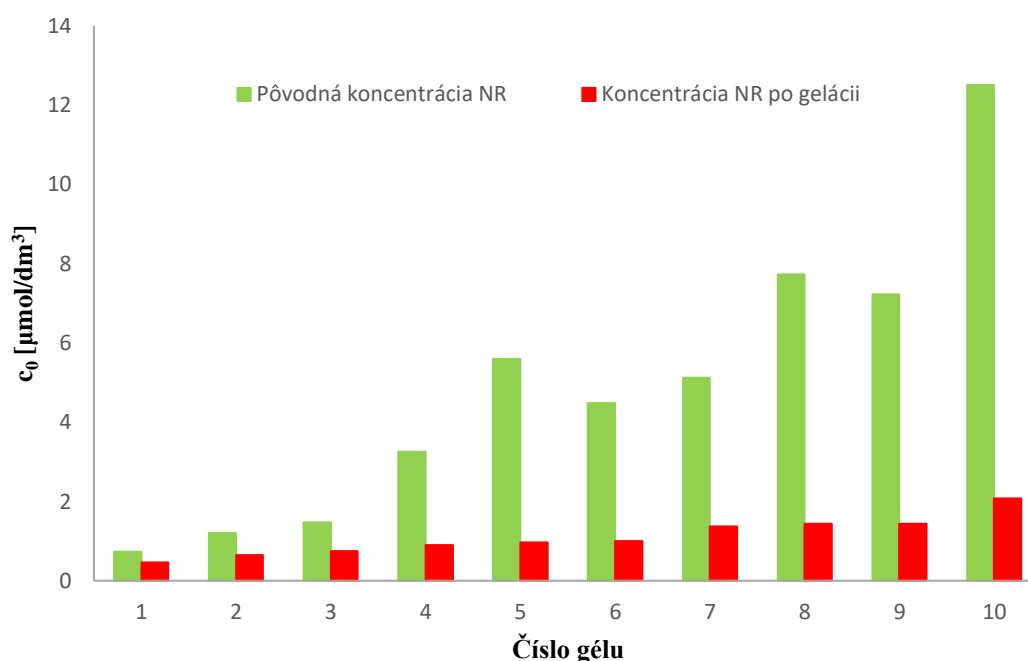
5.3 LMW Hyaluronan s 200 mM Septonexom

Obdobne ako v kap.5.1 boli pripravené aj gély H4 s rozdielom, že použitý hyaluronan bol nízkomolekulárny. Bol dodržaný rovnaký postup aj časové intervaly pri príprave a meraní vzoriek.

Tabuľka 5: Označenie jednotlivých gélov H4, pôvodná koncentrácia NR v roztoku Septonexu a koncentrácia NR v supernatante po gelácii

Označenie gélu	Požadovaná koncentrácia NR [μmol/dm ³]	Presná koncentrácia NR [μmol/dm ³]	Koncentrácia NR v supernatante po gelácii [μmol/dm ³]
1	2	0,732	0,466
2	3,5	1,193	0,645

3	4	1,465	0,753
4	5	3,255	0,896
5	6	5,587	0,968
6	7	4,475	1,004
7	8	5,126	1,362
8	9	7,730	1,434
9	10	7,215	1,434
10	15	12,503	2,079

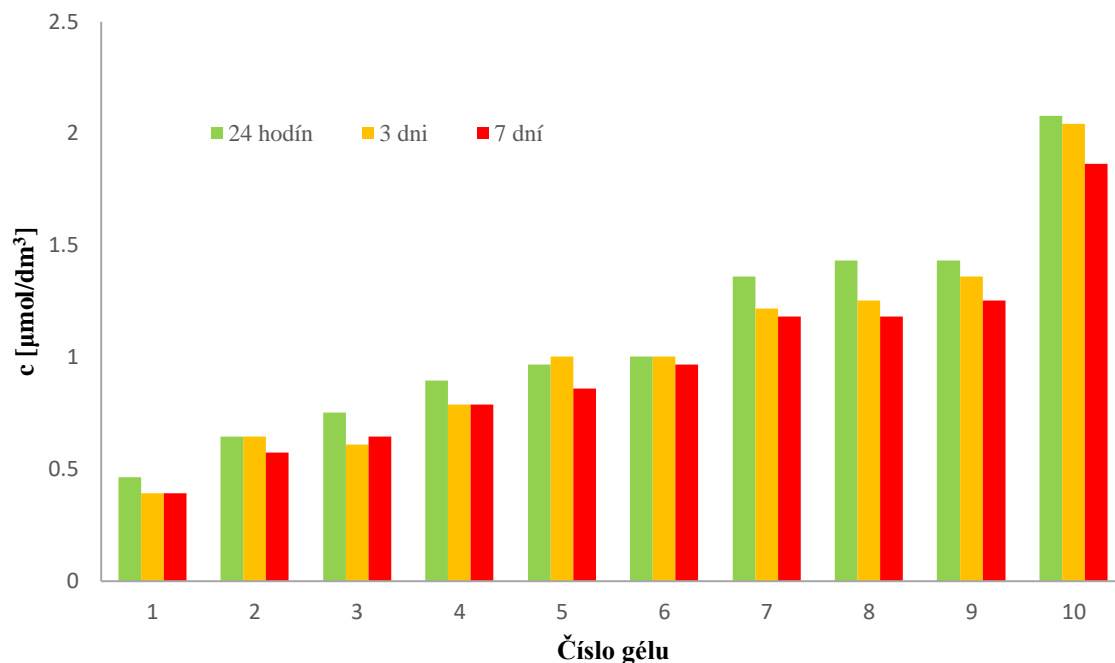


Obr. 13: Porovnanie pôvodnej koncentrácie NR v Septonexe a koncentrácie NR v supernatantoch po gelácii v géloch H4

Z obrázku č. 33 a tabuľky 5 plynie, že koncentrácia NR v pôvodnom roztoku Septonexu po gelácii klesá. Takisto z nich vyplýva, že so zvyšujúcim sa množstvom NR v tenzide rastie aj schopnosť gélu naviazať väčšie množstvo sondy NR. Pokles koncentrácie NR v supernatante po gelácii je spôsobený tým, že gél sa „obohatí“ určitým množstvom NR pri výrobe gélu ktoré bolo obsiahnuté v Septonexe (zásobný roztok Septonexu s koncentračnou radou NR).

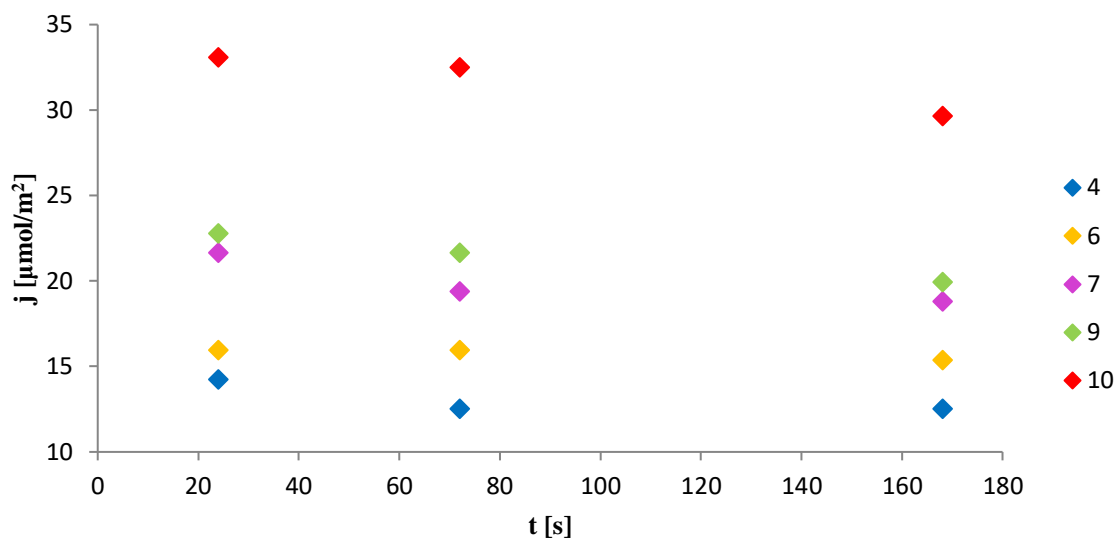
5.3.1 H4 s pôvodným supernatantom

Rovanko ako v predošlých experimentoch aj v prvej sade gélov H4 bol ponechaný pôvodný supernatant. Bola zmeraná absorbancia supernatantov po 24 hodinách, troch dňoch a po týždni od výroby gélu.



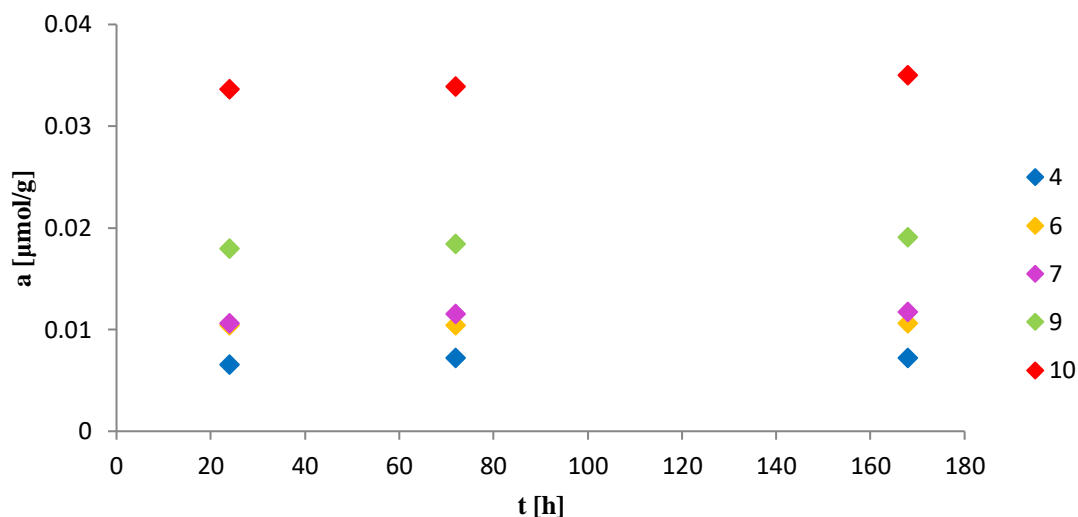
Obr. 34: Zmeny koncentrácií NR v pôvodných supernatantoch gélov H4 sledované po dobu 3 a 7 dní

Z Obr. 34 plynie, že najviac sondy sa v supernatante vyskytovalo po 24 hodinách od prípravy gélov. Potom už dochádzalo k znižovaniu koncentrácie/množstva sondy v supernatantoch, či už po 3 dňoch alebo po týždni od prípravy gélov. Z nameraných výsledkov vyplýva, že po 24 hodinách od prípravy začalo dochádzať k prestupu sondy zo supernatantov do gélov, lebo v géloch boli pravdepodobne ešte voľné „nezaplnené“ miesta, na ktoré sa mohli molekuly sondy naviazať. Ďalej z týchto výsledkov tiež vidíme, že ani po týždni neboli koncentrácie sondy medzi prostrediami vyrovnané a bolo by potrebné vzorky premerať ešte v ďalších časových intervaloch.



Obr. 35: Tok sondy v pôvodnom supernatante vzoriek H4. Pre prehľadnosť sú zobrazené len vybrané gély

So zvyšujúcou sa koncentráciou NR u jednotlivých gélov 1-10 sa zvyšoval aj jej tok (vid' Obr.35). Tak ako v predošlých prípadoch, aj teraz môžeme vidieť, že sa tok v priebehu času znižuje z dôvodu postupného vyrovnávania koncentrácií medzi prostrediami (vid' Obr. 35). Zvyšovaním pôvodnej koncentrácie NR v supernatante sa zvyšovalo aj jej množstvo, ktoré by mohlo byť obsiahnuté v géloch (vid' Obr.36). Predpokladom týchto experimentov bolo, že NR sa bude z gélov postupne uvoľňovať, čo by mohlo simulovať postupnú distribúciu liečiva z gélovej matrice. Tento fakt však vzhľadom k nameraným výsledkom potvrdený nebol, keďže v našom prípade sa najskôr síce sonda z gélu do supernatantu uvoľnila, ale následne na to sa opäť začala inkorporovať naspäť do gélovej štruktúry ako ukazujú obrázky č. 34, 35 a 36.

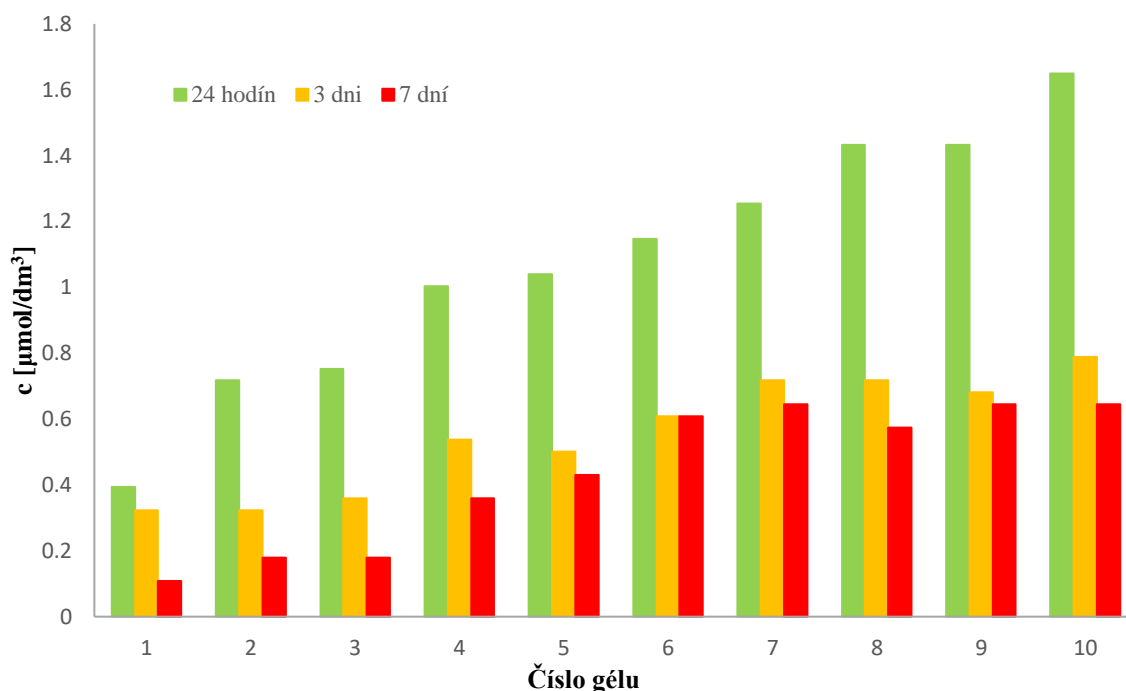


Obr. 36: Množstvo naviazanej sondy vztiahnuté na hmotnosť gélu v závislosti na čase

S ubývajúcim množstvom NR v roztoku sa zvyšuje množstvo, ktoré je v štruktúre gélu. Tieto zmeny popisuje obrázok č. 36. Pre názornú ukážku a prehľadnosť boli vybrané len určité gély.

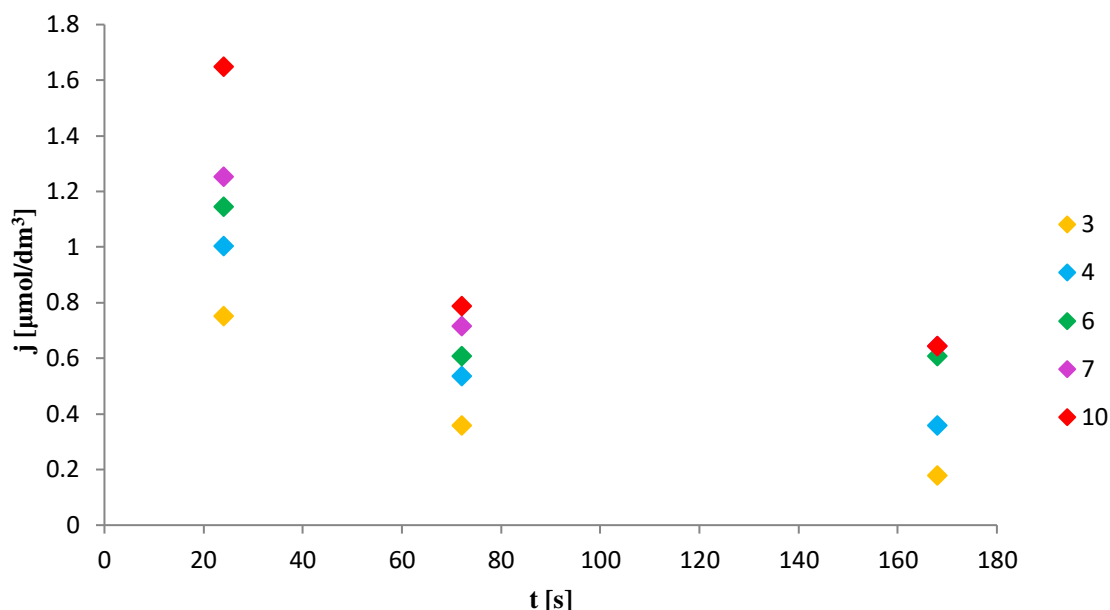
5.3.2 H4 s vymeneným supernatantom za NaCl

Rovnakým spôsobom ako v predošlých sadách gélov, aj pri géloch H4 bol v druhej sade opatrne zliaty a vymenený pôvodný supernatant za 5 ml 0,15 M NaCl. Boli premerané absorbancie sondy v tomto prostredí po 24 hodinách, po 3 dňoch a po týždni.

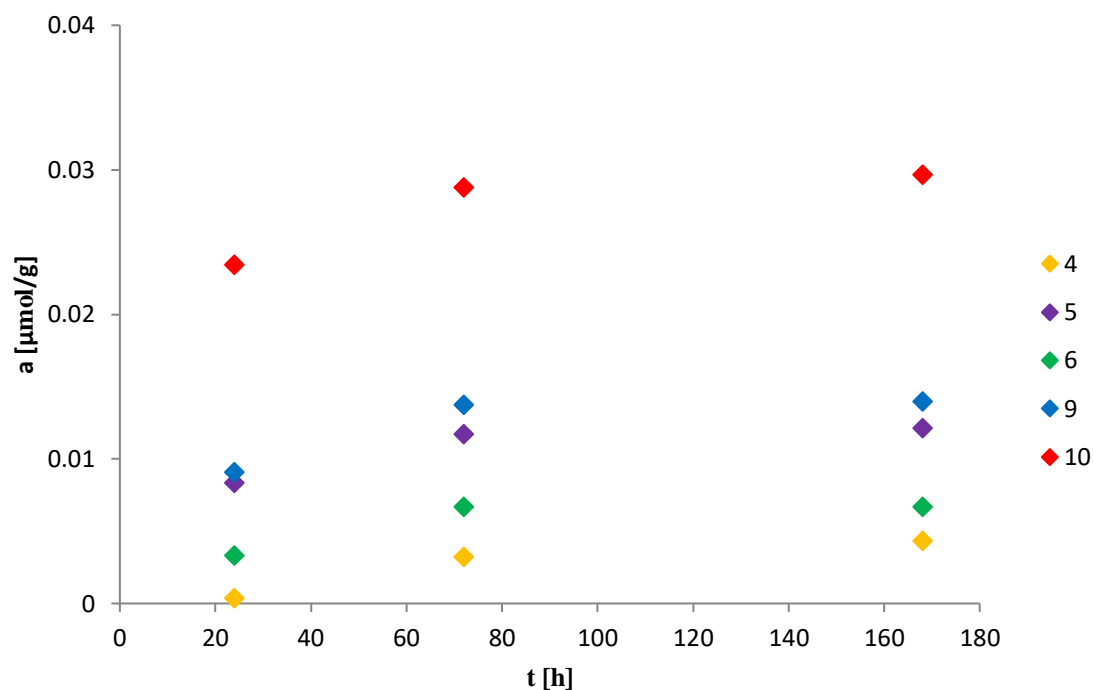


Obr. 37: Zmeny koncentrácií NR v zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl pri géloch H4 sledované po dobu 7 dní

Z obrázku č. 37 je očividné, že koncentrácia NR v supernatante výrazne klesla pri všetkých vzorkoch. Došlo k tomu najprv pri zlievaní, kedy bolo určité množstvo NR naviazané v pôvodnom supernatante, ktorý bol zliaty a vymenený za roztok 0,15 M NaCl. Túto súvislosť opisuje stredný stĺpec v obrázku, teda situácia po troch dňoch. Koncentrácia NR v zamenenom supernatante po týždni klesá. Je pravdepodobné, že sa sonda sústredila späť do gélu, ako v predchádzajúcich prípadoch iných typov gélov so zameneným roztokom NaCl.



Obr. 38: Tok sondy NR vo vybraných zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl v závislosti na čase



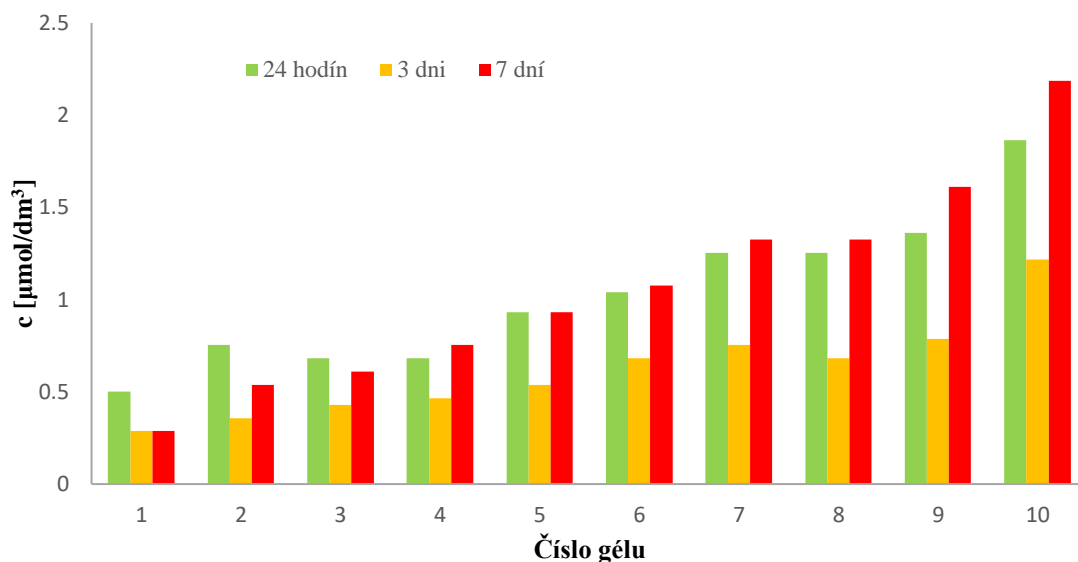
Obr. 39: Množstvo naviazanej sondy vzťahujúce sa na hmotnosť gélu v závislosti na čase

Tak ako aj v predchádzajúcich prípadoch, aj v druhej sade gélov H4 bolo potvrdené, že sa sonda po zmeraných časových intervaloch opäť naväzovala späť do gélu. Na obrázkoch č. 38 a č. 39 sú názorné ukážky toku NR a jej naväzovania späť do gélu. Čím vyššia koncentrácia NR bola v roztokoch, tým viac sa sonda naviazala do štruktúry gélu. Ďalej je z grafu na Obr. 38 vidieť, že tok sondy medzi prostrediami sa s postupom času znižuje ako aj v predošlých prípadoch, aj keď sa ešte nedá povedať, že by po týždni boli koncentrácie sondy

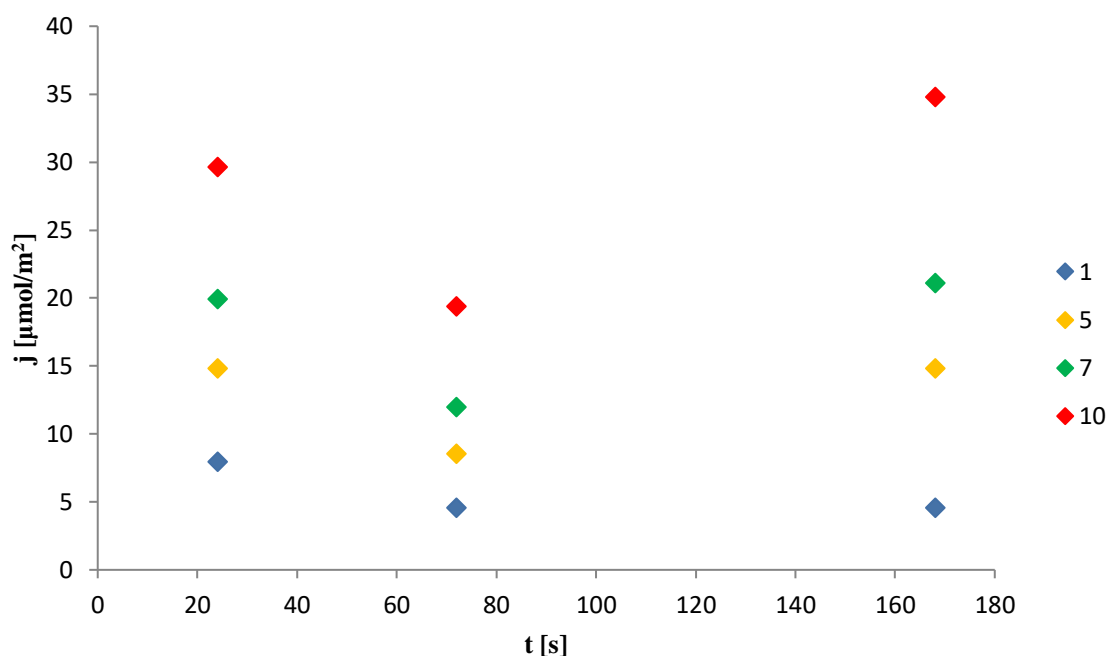
medzi prostrediami vyrovnané. Aj v tomto prípade by bolo vhodné predĺžiť časový interval pozorovania.

5.3.3 H4 s vymeneným supernatantom za Septonex

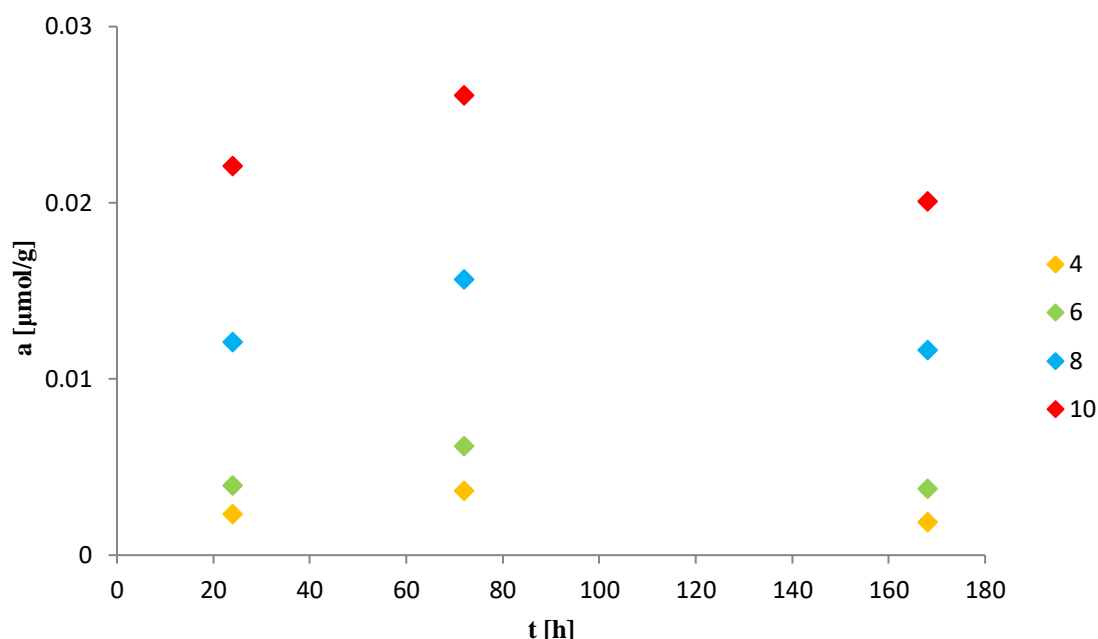
Tretia sada gélov H4 obsahovala vzorky s vymeneným pôvodným supernatantom za 5 ml 200 mM Septonexu. Merania prebehli rovnako ako v predošlých prípadoch tj. po 24 hodinách, po 3 a 7 dňoch.



Obr. 40: Zmeny koncentrácií NR v zamenených supernatantoch za 200 mM Septonex pri géloch H4 sledované po dobu 7 dní



Obr. 41: Tok sondy v géloch H4 po výmene za 200 mM Septonex . Pre prehľadnosť sú zobrazené len vybrané gély



Obr. 42: Množstvo naviazanej sondy vzťahnuté na hmotnosť gélu v závislosti na čase. Pre prehľadnosť boli vybrané len niektoré vzorky

Z výsledkov obsiahnutých a zobrazených na obrázkoch č. 40, 41 a 42 je vidno, že zámena supernatantu za 200 mM Septonex sa javí ako najlepšie prostredie pre transport NR z gélu do roztoku nad gélom. Je to výsledok toho, že vo vymenenom supernatante je mnoho micel do ktorých sa NR môže inkorporovať. Tok sa takisto zvýšil a množstvo naviazanej sondy v géli sa vo všetkých prípadoch gélov znížila, čo vlastne vysvetľuje zvýšenie koncentrácie NR v supernatante.

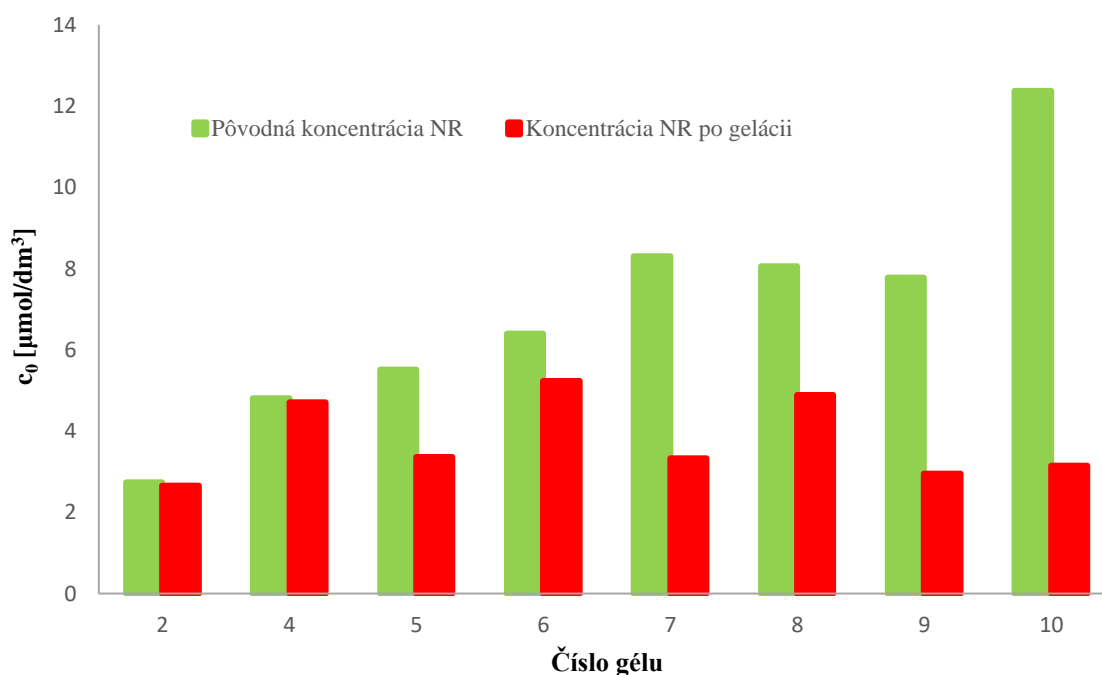
5.4 LMW Hyaluronan so 100 mM Septonexom

Zmiešaním zásobného roztoku LMW Hya o koncentrácii 2 % hm. a 100 mM Septonexu s NR vznikli farebne značené gély H5. Tabuľka č. 6 udáva pôvodnú presnú koncentráciu NR v supernatante a koncentráciu supernatantu po výrobe gélu. Boli zmerané absorbancie všetkých troch sád vzorkov v časovom intervale 24 hodín, 3 a 7 dní.

Tabuľka 6: Označenie jednotlivých gélov H5, pôvodná koncentrácia NR v roztoku Septonexu a koncentrácia NR v supernatante po gelácii

Označenie gélu	Požadovaná koncentrácia NR [μmol/dm ³]	Presná koncentrácia NR [μmol/dm ³]	Koncentrácia NR v supernatante po gelácii [μmol/dm ³]
1	2	1,899	3,988
2	3,5	2,739	2,648
3	4	3,716	4,953
4	5	4,801	4,704

5	6	5,506	3,364
6	7	6,401	5,234
7	8	8,299	3,333
8	9	8,055	4,891
9	10	7,784	2,960
10	15	12,368	3,146

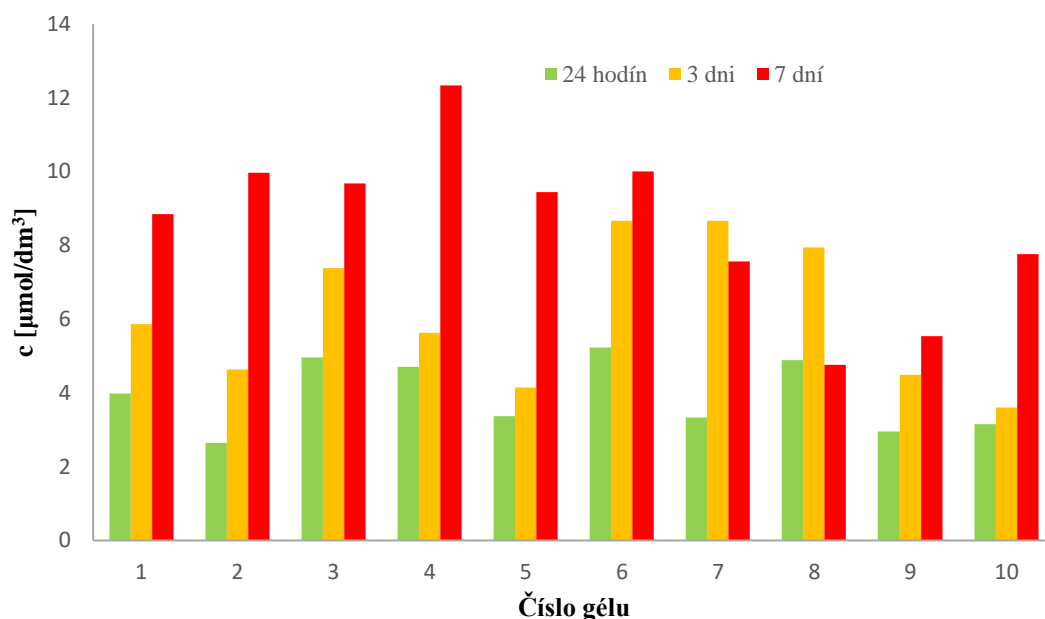


Obr. 43: Porovnanie pôvodnej koncentrácie NR v Septonexe a koncentrácie NR v supernatantoch po gelácii v géloch H5

Tak ako aj v predošlých prípadoch po gelácii a následnom vytvorení gélu, koncentrácia NR v Septonexe klesla. Súvisí to so spotrebou NR v tenzide na vytvorenie gélu. Teda, určitá časť NR obsiahnutá v pôvodnom zásobnom roztoku NR v Septonexe sa zúžitkovala na vytvorenie gélu H5. Z grafu na Obr. 43 však vyplýva, že pri najnižších koncentráciach použitej sondy, je v supernatante aj po gelácii koncentrácia sondy taká istá ako pred geláciou. Tieto výsledky vzoriek sú pravdepodobne zatažené veľkou chybou.

5.4.1 H5 s pôvodným supernatantom

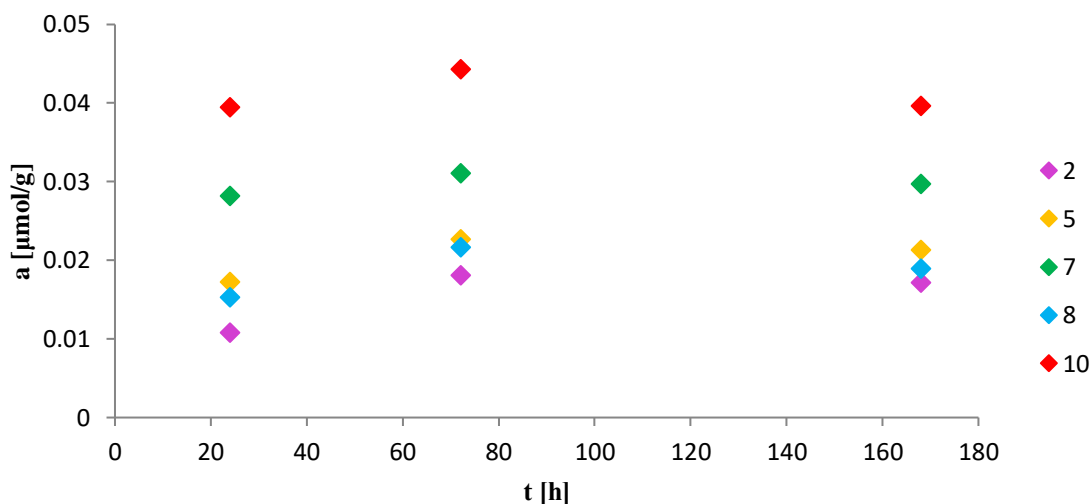
V prvej sade, ako aj v ostatných experimentoch s iným typom gélu, bol v prvej sade ponechaný pôvodný supernatant po celú dobu merania.



Obr. 44: Zmeny koncentrácií NR pôvodných supernatantoch pri géloch H5 sledované po dobu 7 dní

Obrázok č. 44 zobrazuje zmenu pôvodnej koncentrácie NR v Septonexe po gelácii v časových intervaloch uvedených v obrázku. Po troch dňoch sa vo všetkých vzorkách koncentrácia NR v supernatante zvýšila, čo naznačuje kontinuálne uvoľňovanie sa NR z vytvoreného gélu. Takže opäť ani po týždni nedošlo k ustanoveniu rovnováhy medzi prostrediami a neustále dochádzalo k výmene molekúl sondy. Bolo by teda opäť potreba dlhšieho časového intervalu pozorovania. Okrem prípadov vzoriek č. 7 a 8 sa koncentrácia sondy ďalej zvyšovala. V týchto dvoch prípadoch obrázok naznačuje, že sa určité množstvo NR stiahlo späť do gélu.

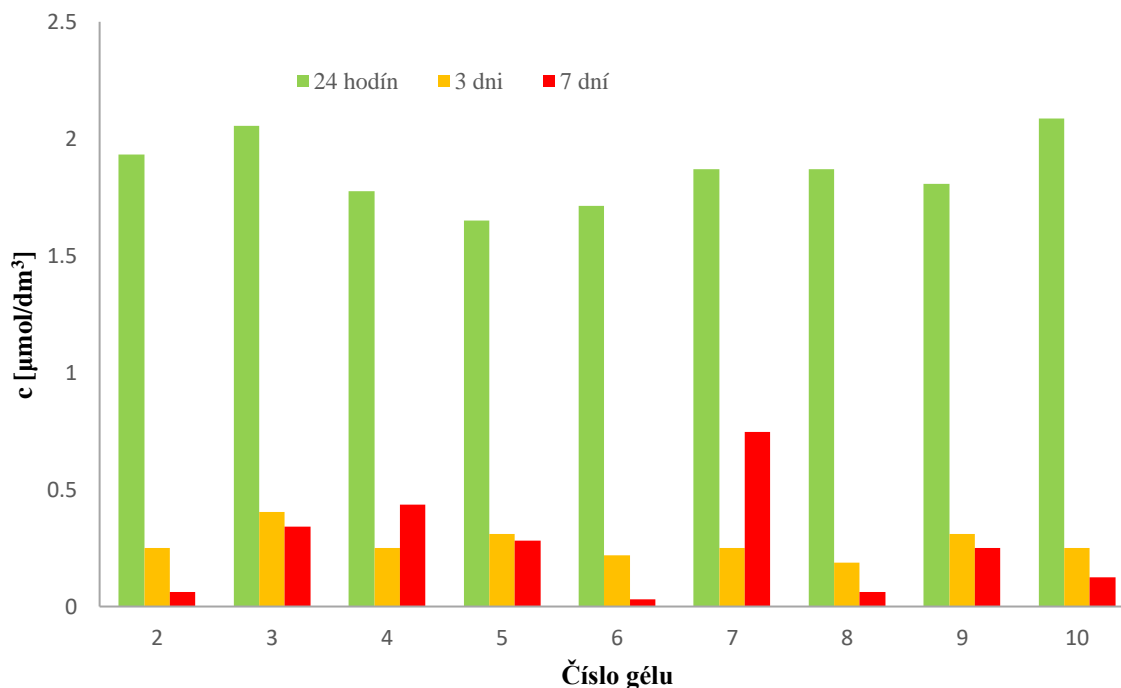
Obrázok č. 45 poukazuje na množstvo naviazanej sondy v géloch H5. Vyznačené hodnoty dopĺňujú tvrdenie spomenuté vyššie, a to, že keď sa koncentrácia NR v supernatante zvyšovala, tak sa množstvo naviazanej sondy v géli znižovalo.



Obr. 45: Množstvo naviazanej sondy vztiahnuté na hmotnosť gélov H5 v závislosti na čase. Pre prehľadnosť boli vybrané len niektoré vzorky

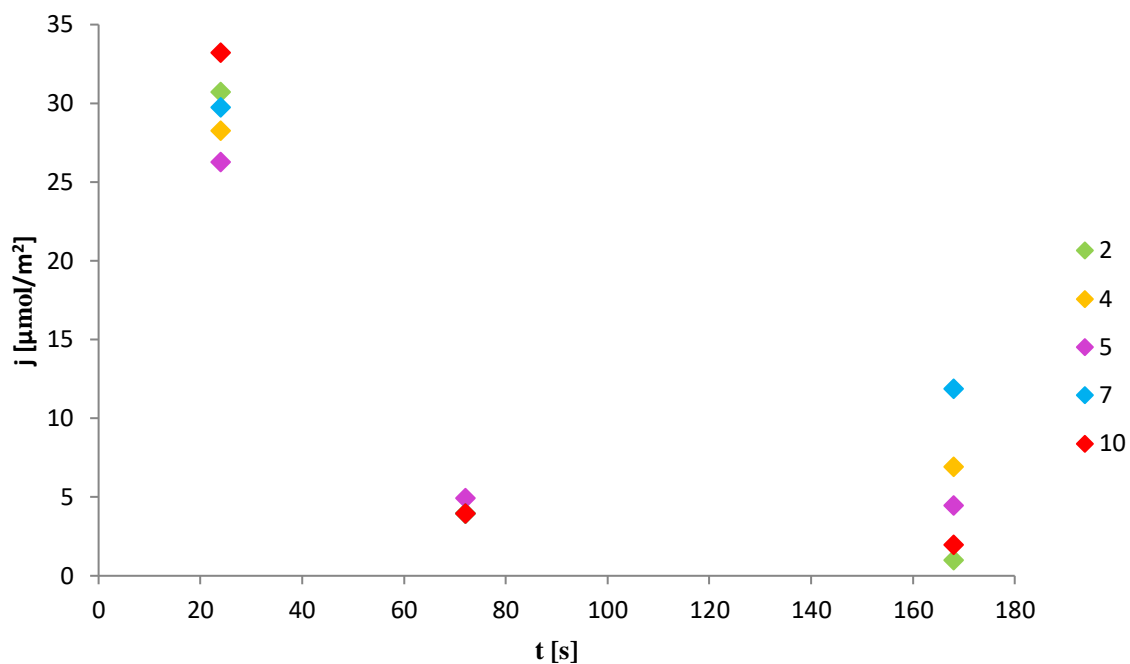
5.4.2 H5 s vymeneným supernatantom za NaCl

V druhej sade vzoriek sa zmenil po 24 hodinách a zmeraní absorbancie pôvodných supernatantov pôvodný supernatant za 5 ml 0,15 M NaCl. Po ďalšiu dobu merania (3 a 7 dní), bol meraný takto vymenený supernatant. Merala sa jeho absorbancia a sledovala sa závislosť toku a množstvo naviazania NR z roztoku gélu a naopak.

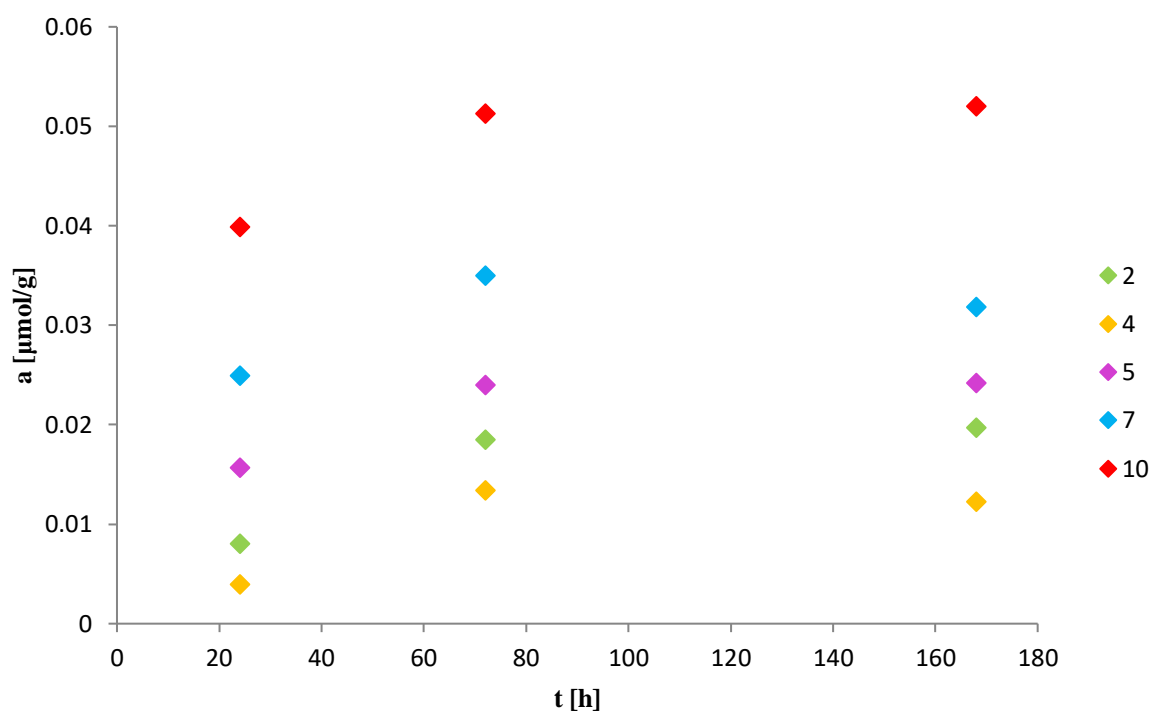


Obr. 46: Zmeny koncentrácií NR v zamenených supernatantoch za 0,15 M NaCl pri géloch H5 sledované po dobu 7 dní

Po výmene pôvodného supernatantu za 0,15 M NaCl došlo ako aj v predošlých prípadoch k odliatiu značného množstva sondy NR obsiahnutej v pôvodnom supernatante a následne bolo sledované uvoľňovanie sondy z gélov do novovymeneného roztoku NaCl. Z výsledkov uvedených na Obr. 46 je značné, že po 3 dňoch od výmeny supernatantu sa z gélov do nových supernatantov malá časť NR uvoľnila, avšak v nasledujúcich dňoch sa vo väčšine prípadov opäť postupne zase zakoncentrovala naspäť do gélov. Výnimku tvorili vzorky č. 4 a 7. Chovanie takéhoto systému bolo popísané v predošlých kapitolách pri zmene supernatantu za roztok NaCl. Gél sa teda obohacoval o sondu, dôsledkom čoho bolo zníženie koncentrácie NR v supernatante a zvýšenie jeho množstva v géloch. Toto chovanie systému popisujú obrázky č. 46, 47 a 48.



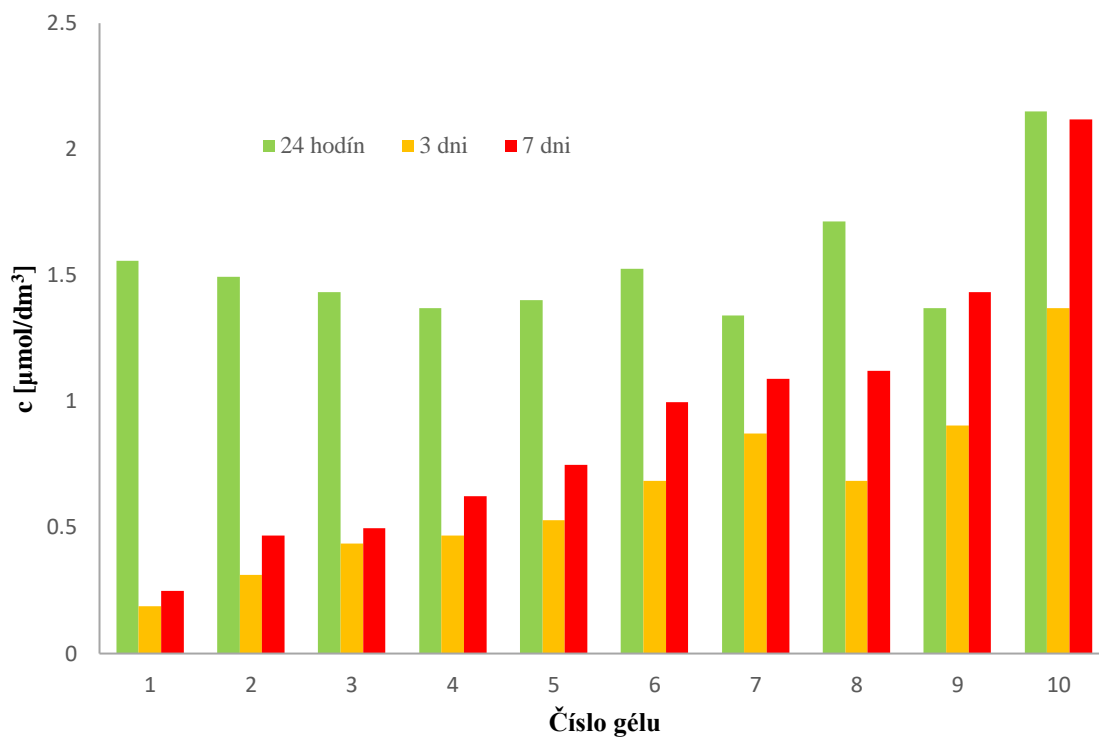
Obr. 47: Rýchlosť toku sondy v géloch H5 po výmene za 0,15 M NaCl. Pre prehľadnosť sú zobrazené len vybrané gély



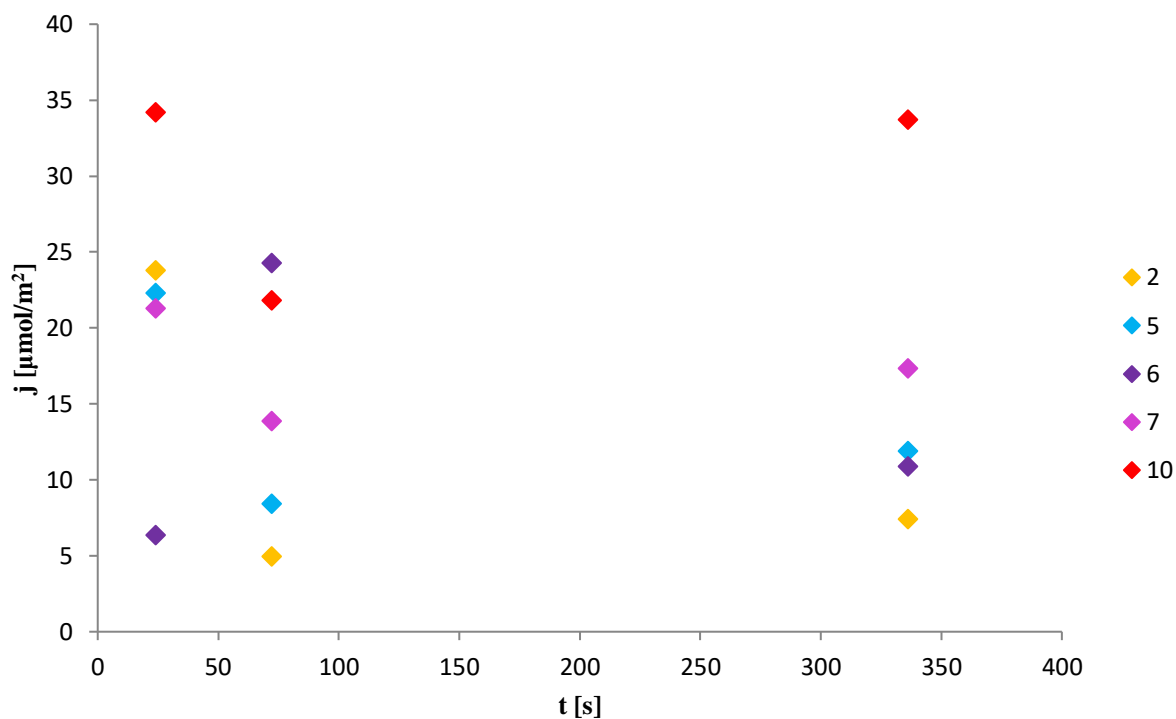
Obr. 48: Množstvo naviazanej sondy vztiahnuté na hmotnosť gélov H5 v závislosti na čase. Pre prehľadnosť boli vybrané len niektoré vzorky

5.4.3 H5 s vymeneným supernatantom za Septonex

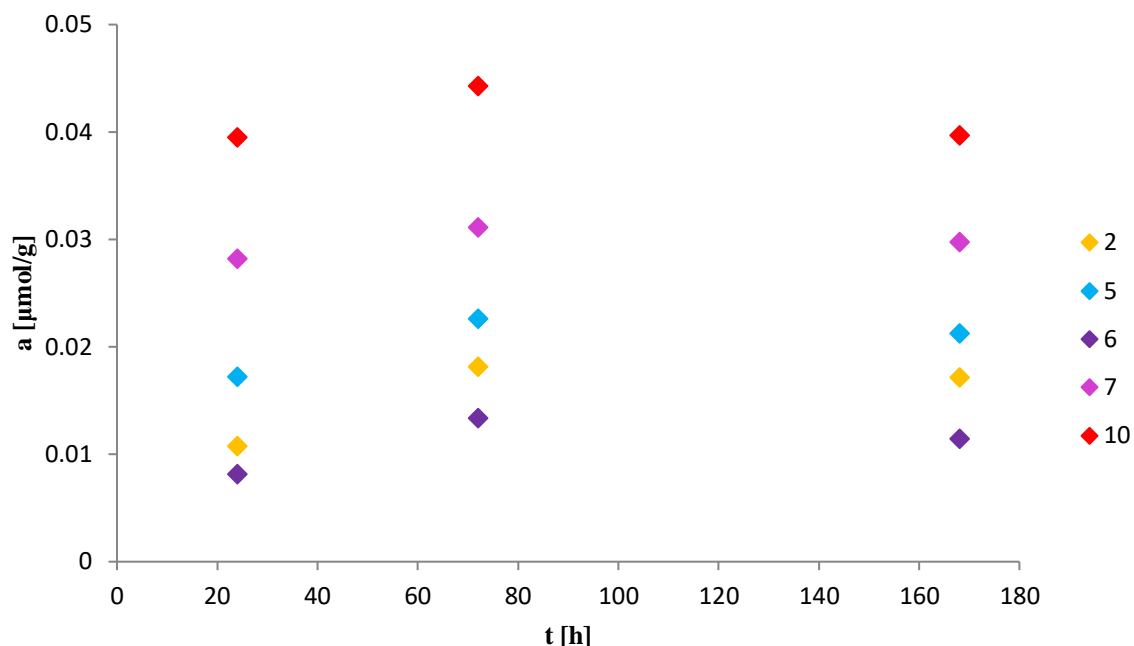
V tretej sade vzoriek gélov H5 bol pôvodný supernatant opatrne zliaty a vymenený za 100 mM Septonex. Tieto vzorky boli v ďalších časových intervaloch (3 a 7 dní) zmerané spektrofotometricky, čím sa namerala absorbancia NR v supernatante.



Obr. 49: Vybrané zmeny koncentrácií NR v zamenených supernatantoch za 100 mM Septonex pri géloch H5 sledované po dobu 7 dní



Obr. 50: Tok sondy v géloch H4 po výmene za 200 mM Septonex . Pre prehľadnosť sú zobrazené len vybrané gély



Obr. 51: Množstvo naviazanej sondy vzťahujúce sa na hmotnosť gélov H5 (so zameneným pôvodným supernatantom za 100 mM Septonex) v závislosti na čase. Pre prehľadnosť boli vybrané len niektoré vzorky

Na obrázku č. 49 je popísaná zmena koncentrácie sondy po výmene supernatantu. Tá jasne ukazuje, že sa koncentrácia sondy v supernatante po troch dňoch výrazne zvyšovala. Môžu za to opäť micely, do ktorých sa NR má možnosť naviazať a teda uvoľniť z gélu. Septonex ako tenzid teda poskytuje priestor pre sondu na uvoľnenie sa zo štruktúry gélu. Opäť, ani po týždni ešte nedošlo k úplnému vyrovnaniu koncentrácií NR medzi géľmi a supernatantmi, takže by bol vhodný dlhší čas pozorovania. Bolo tomu tak vo všetkých sadách gélov, kde sa menil v tretej sade supernatant za Septonex. Tok sondy sa takisto zvyšoval, čo súvisí s výrazným zväčšením koncentrácie NR v supernatante. Naopak, znížilo sa množstvo naviazanej sondy vo všetkých géloch, čo je logické, keďže sonda prechádzala z gélov do supernatantov. Tento popísaný stav je aj vyobrazený na obrázkoch č. 50 a 51.

Tabuľka 7: Zhrnutie vypočítaných difúzných koeficientov pre jednotlivé sady gélov

	Difúzny koeficient [m ² /s]		Difúzny koeficient [m ² /s]		Difúzny koeficient [m ² /s]		Difúzny koeficient [m ² /s]	
H1		H2		H3	H4	H5		H6
1.sada	-	1.sada	-		1.sada	1,33.10 ⁻¹¹	1.sada	3,08.10 ⁻¹¹
2.sada	-	2.sada	2,60.10 ⁻¹⁰		2.sada	1,36.10 ⁻¹⁰	2.sada	-
3.sada	-	3.sada	9,03.10 ⁻¹¹		3.sada	-	3.sada	-

6 ZÁVER

Po premeraní a vyhodnotení všetkých vzoriek gélov sa prišlo na niekoľko zistení. V prvom rade sa neočakávalo, že sa sonda bude vracat' späť do gélu. Očakávalo sa, že sa bude o sondu „obohacovať“ iba supernatant. Ďalším zistením je fakt, že sa prostredie roztoku NaCl ukázalo ako nie veľmi vhodným na uvoľňovanie sa látky z gélu. Ak by nastal opak, a látka by sa do prostredia roztoku NaCl z gélu uvoľňovala, mohli by sme hovoriť o dobrých aplikačných vlastnostiach takéhoto systému, pretože 0,15 M roztok NaCl mal simulovať fyziologický roztok, a teda by bol použiteľný na cielenú distribúciu liečiv v organizme. Najlepším prostredím sa pre uvoľňovanie sondy z gélu javilo prostredie tenzidu Septonexu. Samotný hydrogél bol pripravovaný zo zásobného roztoku tenzidu a teda po výmene supernatantov mu bolo toto prostredie oveľa „bližšie“ ako prostredie spomenutého roztoku NaCl. Boli to práve micely, ktoré umožňovali sonde uvoľňovať sa z gélu do supernatantu viac ako pri roztoku NaCl, aj keď samotný zásobný roztok tenzidu bol pripravovaný v prostredí 0,15 M NaCl.

Tieto experimenty boli pilotnými experimentami v danej oblasti výskumu. Hlavným cieľom bolo najmä preskúmanie možnosti difúzie vybranej sondy v daných vzorkoch. Pre ďalší výskum by bolo pravdepodobne vhodnejšie použitie inej sondy (napr. Atto 488), ktorá je rozpustná aj vo vodnom prostredí, a tým pádom by difúzia mohla prebiehať lepšie aj do fyziologického pufru. Podľa všetkého by bolo aj vhodnejšie použitie citlivejšej metódy (napr. FCS) k meraniu difúzných charakteristík týchto vzorkov.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0331-2.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [3] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [4] DAUTZENBERF, H., W. JAEGER, J. KÖTZ, B. PHILIPP, Ch. SEIDEL, D. STSCHERBINA: *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser/Gardner Publications, Inc, 1994, str. 1-3, ISBN 3-446-17127-3.
- [5] KHABAROV, V. N., P. Ya. BOYKOV a M. A. SEL'YANIN. *Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine*. Chichester, West Sussex, 2015. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [6] HASCALL, Vincent C., Torvard C. LAURENT a . Hyaluronan Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [7] Hyaluronic acid. In: *Sanguineskincare* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://www.sanguineskincare.com/whats-the-difference-between-hyaluronic-acid-and-sodium-hyaluronate/>.
- [8] Nečas, J., Barošíková, L., Brauner, P., Kolář, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*, 2008, roč. 53, č. 8, s. 397–411.
- [9] Model of the hyaluronan ribbon in a 3-dimensional domain. In: *Vismed.trbchemedica* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/structure-of-hyaluronan>.
- [10] Function of Hyaluronan. *Vismed.trbchemedica* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/function-of-hyaluronan>.
- [11] Hyaluronan in aqueous solution, with formation of water bridges. In: *Vismed.trbchemedica* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/function-of-hyaluronan>.
- [12] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*. Sciyo, 2010, 2010-09-28. DOI:

- 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>.
- [13] Sources of Hyaluronan. *Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine*. Chichester, West Sussex, 2015, s. 3-6. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [14] *Properties of Hyaluronan* [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/properties-of-hyaluronan>.
- [15] PECHAR, M. et al.: Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*, 2009, roč. 103, č. 1, s. 3-10.
- [16] JAIN, K.: *Drug Delivery in Cancer, Technologies and Commercial Opportunities*. Decision Resources, Inc., Waltham 2000.
- [17] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range as biomedical and industrial applications. *Springer Science + Business Media*, 2006, v. 351, s. 2-10.
- [18] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, **2013**, 1-14. DOI: 10.1155/2013/624967. ISSN 1687-9341. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/archive/2013/624967/>.
- [19] Povrchově aktivní látky. *Informační systém Masarykovy Univerzity* [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2014/BLKLC011p/um/Povrchove_aktivni_latky.pdf.
- [20] Struktura tenzidu. In: *Informační systém Masarykovy Univerzity* [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2014/BLKLC011p/um/Povrchove_aktivni_latky.pdf.
- [21] NOVÁK, Josef P. *Fyzikální chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0436-X.
- [22] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Hoboken, NJ, c2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [23] Carbethopendecinium bromide. In: *Chemspider.com* [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.141396.html?rid=108dba47-60b3-454c-96df-7713166a82cc>.

- [24] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Atkins' physical chemistry*. 9th ed. Oxford: Oxford University Press, c2010. ISBN 978-019-9543-373.
- [25] Micela. In: *Centrum informačných služeb VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/micela_-asociativni-.html.
- [25] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2015, **6**(2), 105-121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>.
- [26] CALÓ, Enrica a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015, **65**(2), 252-267. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305714004091>.
- [27] Difuze koloidů. *Centrum informačných služeb VŠCHT PRAHA* [online]. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/difuze_koloidu.html.
- [28] Direction of diffusion. In: *Plasma Membrane and Cellular Transport* [online]. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <http://www.prism.gatech.edu/~gh19/b1510x/memtra.html>.
- [29] Klučáková M., Pekař M. Physical and Chemical Kinetics in Humic Dispersions. In *Humic Substances: Molecular Details and Applications in Land and Water Conservation* (Ghabbour E.A., Davies G., Eds.). Taylor & Francis, New York 2005, p.167-188. ISBN 1-59169-031-5.
- [30] Hrubý, M., Kučka, J., Kozempel, J., Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, s. 10–16.
- [31] KAROUSOU, Evgenia, Suniti MISRA, Shibnath GHATAK, et al. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biology*. 2017, **59**, 3-22. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.10.001. ISSN 0945053X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X16301706>.
- [32] Iris, K., Mauck, R. L., Burdick, J. A.: Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, 2011, roč. 32, č. 34, s. 8771–8782.
- [33] Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T., Hennink, W. E.: Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 161, č. 2, s. 680–692.
- [34] Tao, Y., Xu, J., Chen, M., Bai, H., Liu, X.: Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*, 2012, roč. 88, č. 1, s. 118–124.

- [35] Yoon, H. Y., Koo, H., Choi, K. Y., Kwon, I. Ch., Choi, K., Park, J. H., Kim, K.: Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for invivo tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2013, roč. 34, č. 21, s. 5273–5280.
- [36] OH, Jung Kwon, Do Ik LEE a Jong Myung PARK. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*. 2009, **34**(12), 1261-1282. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.08.001. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967000900080X>.
- [37] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant. *The Journal of physical chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478–1483.
- [38] SAUEROVÁ, Pavla, Martina VERDÁNOVÁ, Filip MRAVEC, Tereza PILGROVÁ, Tereza VENEROVÁ, Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, **483**, 155-161. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.058. ISSN 09277757. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715300741>.
- [39] Yin, D., Yang, W., Ge, Z., Yuan, Y.: A fluorescence study of sodium Hyaluronate/surfactant interaction in aqueous media. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s. 1201–1206.

8 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Zoznam skratiek

Skratka

CD44

CMC

DLS

FCS

Hya

HMW Hya

LMW Hya

M_w

NMR

PAL

PEG

PTX

Význam

špecifický receptor pre hyaluronan

kritická micelárna koncentrácia

dynamický rozptyl svetla

fluorescenčná korelačná spektroskopia

hyaluronan

hyaluronan o vysokej molekulovej hmotnosti

haluronan o nízkej molekulovej hmotnosti

molekulová hmotnosť

nukleárna magnetická rezonancia

povrchovo aktívna látka

polyetylén glykol

paclitaxel

8.2 Zoznam symbolov

Symbol

D

$\frac{dc_i}{dx}$

$\frac{dc_i}{d\tau}$

J_i

Význam

difúzny koeficient

koncentračný gradient (zmena koncentrácie so vzdialenosťou)

zmena koncentrácie v čase

difúzny tok